



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

A IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO EM CÃES -  
DIVERSAS ABORDAGENS ANALÍTICAS EM MEDICINA VETERINÁRIA

JOÃO MIGUEL NÓBREGA DA SILVEIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes  
Vitor Villa de Brito

Dr. Martinho Morgado Capelão

ORIENTADOR

Dr. Martinho Morgado Capelão

COORDINADORA

Doutora Graça Maria Alexandre  
Pires de Lopes de Melo

2017

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

A IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO EM CÃES -  
DIVERSAS ABORDAGENS ANALÍTICAS EM MEDICINA VETERINÁRIA

JOÃO MIGUEL NÓBREGA DA SILVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes  
Vitor Villa de Brito

Dr. Martinho Morgado Capelão

ORIENTADOR

Dr. Martinho Morgado Capelão

COORDINADORA

Doutora Graça Maria Alexandre  
Pires de Lopes de Melo

2017  
LISBOA

---

## Agradecimentos

Ao Dr. Martinho Capelão, do Hospital Veterinário do Restelo, por ter aceitado ser meu orientador, por me ter acompanhado não só ao longo do meu estágio curricular como também durante a elaboração desta dissertação, por ter colhido grande parte das amostras de LCR utilizadas e, sobretudo, por tudo o que me ensinou nesse período, fundamental para a minha formação profissional.

À minha coorientadora, Professora Doutora Graça Pires, um agradecimento muito especial pela constante preocupação e disponibilidade para me ajudar na escolha do tema, na construção desta dissertação, na disponibilização dos meios necessários à análise das amostras e no esclarecimento de qualquer dúvida que me tenha surgido. Muito obrigado pelos seus ensinamentos e pelo apoio nos meus momentos de ansiedade e insegurança.

Ao Senhor Professor Doutor António Ferreira, Diretor do Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária, pela cedência de amostras de LCR.

Ao Dr. Jorge Cid e ao Dr. Diogo Magno por permitirem a realização do estágio curricular no Hospital Veterinário do Restelo. Aos médicos veterinários que tive o prazer de conhecer e acompanhar ao longo dos 6 meses, em especial à Dra. Joana Sismeiro, pela simpatia e disponibilidade em ajudar na discussão do tema, no acondicionamento das amostras e no fornecimento de elementos úteis à realização desta dissertação, ao Dr. Hugo Lucas e à Dra. Marta Cipriano pela ajuda na colheita de amostras e pelos conhecimentos transmitidos. Aos enfermeiros veterinários pela ajuda nas mais variadas tarefas, em especial aos enfermeiros da cirurgia, Inês, Ana e João pela informação fornecida para esta dissertação.

À Doutora Catarina Martins pela ajuda nas aquisições nas análises por citometria de fluxo.

Aos meus amigos de faculdade com quem tive o privilégio de partilhar a minha vida académica, os jantares, os trabalhos, as festas e as épocas de exames. À Lili, minha companheira 7 dias por semana, e à Sara, minha voz da consciência, por terem festejado comigo as grandes alegrias e por me terem apoiado incondicionalmente nos momentos mais difíceis. À Mariana, pelas tardes de limpeza e legumes da quinta, à Maria pelo carinho e receitas *vegan*, à Gomes pelas boleias e pelos *stickers*, à Clarisse pela abrótea, à Pon pelos fortes abraços, à Esmeralda pelo companheirismo e aos restantes amigos Mestre, Gonçalo, Toja, Inês, Marisa, Bárbara e Patrícia pelos momentos partilhados.

Um sentido e profundo agradecimento a toda a VETuna pelas experiências vividas, pela aprendizagem tanto a nível musical como social, por me ter proporcionado momentos de pura felicidade e por me ter dado forças para continuar a lutar, durante estes longos 6 anos. Em particular, à Madeira pela amizade de ouro e pelas aulas de piano e ao meu afilhado Gonçalo, por ter sido o melhor aprendiz e pelas placagens. Um especial agradecimento aos meus parceiros das pandeiretas por me terem acompanhado na atividade que mais prazer me deu, pelos treinos, pelo trabalho em equipa e pelos prémios, em especial, à Rita pelo carinho e pelas montas.

À Pomba pela sua amizade e disponibilidade em ajudar. Ao Felipe pelas dicas sobre o tema e pela grande ajuda prestada. À minha madrinha de curso, Cristina e às minhas afilhadas, Mariana e Sofia, pelas amizades desenvolvidas.

Aos meus amigos da ilha da Madeira, em especial, à Patrícia pela amizade duradoura e pela companhia e apoio nesta aventura por Lisboa.

E, por fim, mas não menos importante, aos meus pais que, apesar de distantes, sempre acreditaram em mim, sempre se mostraram dispostos a ajudar e sempre apoiaram as minhas decisões, permitindo que pudesse frequentar e concluir este curso. À minha irmã pela confiança nas minhas capacidades, apoio constante e compreensão.

# **A IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO EM CÃES - DIVERSAS ABORDAGENS ANALÍTICAS EM MEDICINA VETERINÁRIA**

## **Resumo**

A análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) é um meio complementar de diagnóstico importante na abordagem a doenças que afetem o sistema nervoso central (SNC). As alterações encontradas no LCR, muitas vezes, auxiliam na exclusão de diagnósticos diferenciais, embora raramente sejam indicativas de um diagnóstico definitivo. A citometria de fluxo (CF) é um método analítico que permite a avaliação qualitativa e quantitativa de múltiplos parâmetros celulares, sendo cada vez mais utilizada em medicina veterinária, especialmente nos campos da imunologia e hematologia.

Esta dissertação teve como objetivo estudar a distribuição das populações de leucócitos através da análise de amostras de LCR, e de sangue periférico, por CF, no sentido de avaliar alterações no LCR no decorrer de doenças do SNC. Serão apresentados três casos clínicos, nos quais foram obtidas as percentagens das principais populações de leucócitos (neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos) e das subpopulações de linfócitos, nomeadamente, linfócitos B, T auxiliares e T citotóxicos. Em cada caso, ocorreu uma inversão da subpopulação de linfócitos T predominante, entre o sangue periférico e o LCR, que poderá estar associada a doença. Nas amostras de sangue periférico, a percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> excedeu a de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, sendo esta, por sua vez, a predominante no LCR.

Os resultados sugerem que a análise de LCR por CF pode fornecer informação complementar relevante ao diagnóstico de doenças do SNC, dando espaço a novas aplicações para a CF em medicina veterinária.

**Palavras-chave:** líquido cefalorraquidiano, citometria de fluxo, imunofenotipagem, leucócitos



# CLINICAL IMPORTANCE OF CEREBROSPINAL FLUID ANALYSIS IN DOGS – SEVERAL ANALYTICAL METHODS IN VETERINARY MEDICINE

## Abstract

Cerebrospinal fluid (CSF) analysis is an important complementary diagnostic procedure available for the diagnosis of central nervous system (CNS) diseases. Despite of rarely providing a definitive diagnosis, CSF changes can often help to narrow down the list of differential diagnoses. Flow cytometry is an analytical method that allows qualitative and quantitative assessment of multiple parameters of individual cells. This technology has become routinely used in veterinary medicine, particularly in immunology and hematology.

This dissertation aimed to study the distribution of leukocytes through the analysis of CSF and peripheral blood samples by flow cytometry assessing its importance in the diagnosis of CNS diseases. Three clinical cases will be presented, in which the percentage of the main populations of leukocytes (neutrophils, monocytes/macrophages and lymphocytes) and lymphocytes subtypes, namely B, T helper and T cytotoxic lymphocytes were obtained. In each case, there was an inversion of the predominant T lymphocyte subtype between peripheral blood and CSF, which may be associated with disease. In the peripheral blood samples, the percentage of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes exceeded the CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, which was the predominant subtype in CSF. The results suggest that the CSF analysis by flow cytometry can provide additional relevant information to the diagnosis of CNS diseases, giving space for new applications for flow cytometry in veterinary medicine.

**Key words:** cerebrospinal fluid, flow cytometry, immunophenotyping, leukocytes





## Índice Geral

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>i</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>x</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>x</b>
<b>Índice de Gráficos .....</b>	<b>x</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>xi</b>
<b>A. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>B. Revisão bibliográfica .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Embriologia do SNC.....</b>	<b>1</b>
1.1. Gastrulação e a indução do sistema nervoso.....	1
1.2. Neurulação e segmentação do tubo neural .....	2
1.3. Linhagens celulares na histogénese do SNC .....	2
1.4. Vesículas encefálicas, meninges e sistema ventricular encefálico .....	4
<b>2. Anatomohistologia do SNC .....</b>	<b>4</b>
2.1. Medula espinhal.....	5
2.2. Encéfalo.....	6
2.3. Meninges .....	6
2.4. Ventrículos cerebrais e epêndima .....	6
2.5. Plexos coroides.....	7
<b>3. Fisiologia do LCR.....</b>	<b>8</b>
3.1. Barreira hematoencefálica (BHE).....	8
3.2. Barreira sangue-LCR (BSLCR) .....	9
3.3. Produção de LCR .....	10
3.4. Fluxo de LCR .....	11
3.5. Absorção do LCR.....	11
3.6. Funções do LCR.....	13
<b>4. Colheita de LCR .....</b>	<b>14</b>
4.1. Indicações.....	14
4.2. Contraindicações e riscos .....	15
4.3. Complicações .....	16
4.4. Técnicas de colheita .....	17
4.4.1. Generalidades .....	17
4.4.2. Punção da cisterna magna .....	18
4.4.3. Punção da região lombar .....	20
4.5. Processamento e acondicionamento da amostra.....	21
<b>5. Análise de LCR.....</b>	<b>23</b>
5.1. Avaliação macroscópica .....	24

5.1.1.	Coloração .....	24
5.1.2.	Turvação .....	25
5.2.	Análise quantitativa.....	25
5.2.1.	Parâmetros bioquímicos .....	25
5.2.1.1.	Concentração da proteína total .....	25
5.2.1.1.1.	Albumina e quociente de albumina .....	28
5.2.1.1.2.	$\gamma$ -globulinas e índice de IgG .....	29
5.2.1.1.3.	IgM e IgA .....	30
5.2.1.2.	Determinação de títulos de anticorpos específicos .....	30
5.2.1.3.	Dissociação albuminocitológica .....	31
5.2.1.4.	Glucose.....	31
5.2.1.5.	Eletrólitos e enzimas .....	32
5.2.2.	Contagens celulares .....	32
5.3.	Avaliação citológica .....	33
5.3.1.	Métodos de preparação citológica .....	33
5.3.2.	Contagens diferenciais de células nucleadas .....	35
5.3.3.	Pleocitose .....	35
5.3.3.1.	Pleocitose neutrofílica .....	36
5.3.3.2.	Pleocitose mononuclear .....	37
5.3.3.2.1.	Linfócitos .....	37
5.3.3.2.2.	Monócitos .....	39
5.3.3.3.	Pleocitose eosinofílica.....	39
5.3.3.4.	Pleocitose mista.....	40
5.3.4.	Outros achados .....	40
5.4.	Outros testes laboratoriais .....	41
5.4.1.	Cultura de LCR.....	41
5.4.2.	PCR.....	42
<b>C.</b>	<b>A utilização da CF como método analítico na doença do SNC que provoque alterações no LCR .....</b>	<b>43</b>
<b>1.</b>	<b>Citometria de fluxo.....</b>	<b>43</b>
1.1.	Fundamentos da técnica.....	43
1.2.	Limitações da técnica .....	47
1.3.	Aplicabilidade clínica .....	47
1.3.1.	Hematologia .....	48
1.3.2.	Imunologia.....	48
1.3.3.	Oncologia .....	50
1.3.4.	Outras aplicações.....	51
1.3.5.	Aplicações com base na avaliação do LCR .....	51
<b>2.</b>	<b>Parte prática .....</b>	<b>52</b>
2.1.	Objetivos.....	52

2.2.	Materiais .....	52
2.2.1.	Caso Clínico 1 .....	53
2.2.2.	Caso Clínico 2 .....	54
2.2.3.	Caso Clínico 3 .....	54
2.3.	Metodologia .....	55
2.3.1.	Técnica de colheita utilizada .....	55
2.3.2.	Acondicionamento e preparação das amostras .....	56
2.3.3.	Análise por CF .....	57
2.4.	Resultados.....	57
2.4.1.	Caso Clínico 1 .....	57
2.4.2.	Caso Clínico 2 .....	59
2.4.3.	Caso Clínico 3 .....	60
2.5.	Discussão .....	61
2.5.1.	Caso Clínico 1 .....	62
2.5.2.	Caso Clínico 2 .....	63
2.5.3.	Caso Clínico 3 .....	65
<b>D.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>68</b>
<b>E.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>70</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Vistas dorsais e transversais de embriões de mamíferos em desenvolvimento com representação da formação do tubo neural. ....	3
<b>Figura 2</b> – Vista lateral (A) e secção (B) do encéfalo em desenvolvimento com identificação das flexuras, cefálica e cervical, e das vesículas encefálicas. ....	4
<b>Figura 3</b> – Secção longitudinal da extremidade caudal da coluna vertebral mostrando uma vista dorsal da cauda equina e do filo terminal. ....	5
<b>Figura 4</b> – Vista dorsal do sistema ventricular do encéfalo do cão. ....	7
<b>Figura 5</b> – Representação esquemática da morfologia da BHE (A) e da BSLCR (B). ....	10
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática do fluxo de LCR desde a sua produção até a sua absorção na região craniana (A), evidenciando a relação das meninges com as estruturas contíguas na região craniana (B) e na região espinhal (C). ....	12
<b>Figura 7</b> – Determinação do local de inserção da agulha para a colheita de LCR a partir da cisterna magna, com representação dos pontos de referência anatómicos. ....	19
<b>Figura 8</b> – Determinação do local de inserção da agulha para a colheita de LCR na região lombar, com representação dos pontos de referência anatómicos para cães pequenos. ....	21
<b>Figura 9</b> – Sistema utilizado para a sedimentação de amostras de LCR com demonstração da fixação da base da seringa sobre a lâmina pelas molas. ....	35
<b>Figura 10</b> – Representação esquemática da ligação de uma imunoglobulina a um fluorocromo e da sua utilização na identificação de moléculas CD na superfície celular. ....	44
<b>Figura 11</b> – Representação esquemática do mecanismo de análise de um citómetro de fluxo, incluindo, sequencialmente: a entrada da amostra na câmara do fluxo; a condução da suspensão celular envolvida numa solução tampão, num fluxo laminar contínuo; a passagem do fluxo pelo <i>laser</i> ; a deteção frontal e lateral da luz dispersada pelas células, pelo fotodíodo e pelos tubos fotomultiplicadores; a separação do fluxo em gotículas; a aplicação de cargas elétricas sobre as mesmas; a passagem das gotículas pelas placas de deflexão e, por fim, a recolha diferencial das gotículas e resíduos. ....	46
<b>Figura 12</b> – A – Determinação dos pontos de referência anatómicos para a colheita de LCR. B – Remoção do estilete na colheita de LCR. ....	56
<b>Figura 13</b> – Recolha do LCR por sucção suave, através de uma seringa. ....	56

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Interpretação das leituras de tira urinária na análise da concentração de proteína do LCR. ....	27
<b>Tabela 2</b> – Diagnósticos diferenciais com base apenas na CTCN. ....	35
<b>Tabela 3</b> – Resultados da avaliação macroscópica e quantitativa do LCR do caso clínico 1..	53
<b>Tabela 4</b> – Resultados da avaliação macroscópica e quantitativa do LCR do caso clínico 2..	54
<b>Tabela 5</b> – Resultados da avaliação macroscópica e quantitativa do LCR do caso clínico 3..	55

## Índice de Gráficos

<b>Gráfico 1</b> – <i>Dot-plot</i> resultante da avaliação de sangue periférico canino com identificação das principais populações leucocitárias, nomeadamente neutrófilos (azul), monócitos (verde) e linfócitos (vermelho), de acordo com as características da FSC e SSC da luz pelas células..	49
<b>Gráfico 2</b> – <i>Dot-plots</i> resultantes da análise do sangue apresentando: a distribuição de leucócitos, de acordo com as características da FSC e SSC da luz pelas células, com destaque da população de linfócitos a vermelho (A); a distribuição de linfócitos, de acordo com as características da SSC da luz pelas células e identificação da subpopulação de linfócitos T pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD3-FITC, destacada a vermelho (B); a distribuição dos linfócitos T, células CD3-FITC positivas e CD4-APC positivas (células CD4 <sup>+</sup> , destacadas a verde, e as CD4 <sup>-</sup> (CD8 <sup>+</sup> ), destacadas a azul (C)). ....	58

<b>Gráfico 3</b> – <i>Dot-plots</i> resultantes da análise do LCR apresentando: a distribuição de leucócitos, segundo as características da FSC e SSC da luz pelas células, com destaque da população de linfócitos a vermelho (A); a distribuição de linfócitos, de acordo com as características da SSC da luz pelas células e identificação da subpopulação de linfócitos T pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD3-FITC, destacada a vermelho (B); a distribuição dos linfócitos T, células CD3-FITC positivas e CD4-APC positivas (células CD4 <sup>+</sup> , destacadas a verde, e as CD4 <sup>-</sup> (CD8 <sup>+</sup> ), destacadas a azul (C)).....	58
<b>Gráfico 4</b> – <i>Dot-plots</i> resultantes da análise do sangue apresentando: a distribuição de leucócitos, segundo as características da FSC e SSC da luz pelas células, com destaque da população de linfócitos a vermelho (A); a distribuição de linfócitos, de acordo com as características da SSC da luz pelas células e identificação da subpopulação de linfócitos T pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD3-FITC, destacada a vermelho (B); a distribuição dos linfócitos T, células CD3-FITC positivas e CD4-APC positivas (células CD4 <sup>+</sup> , destacadas a verde, e as CD4 <sup>-</sup> (CD8 <sup>+</sup> ), destacadas a azul (C)).....	59
<b>Gráfico 5</b> – <i>Dot-plots</i> resultantes da análise do LCR apresentando: a distribuição de leucócitos, segundo as características da FSC e SSC da luz pelas células, com destaque da população de linfócitos a vermelho (A); a distribuição de linfócitos, de acordo com as características da SSC da luz pelas células e identificação da subpopulação de linfócitos T pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD3-FITC, destacada a vermelho (B); a distribuição dos linfócitos T, células CD3-FITC positivas e CD4-APC positivas (células CD4 <sup>+</sup> , destacadas a verde, e as CD4 <sup>-</sup> (CD8 <sup>+</sup> ), destacadas a azul (C)).....	59
<b>Gráfico 6</b> – <i>Dot-plots</i> resultantes da análise do sangue apresentando: a distribuição de leucócitos, segundo as características da FSC e SSC da luz pelas células, com destaque a azul da população de neutrófilos, a verde da de monócitos e a vermelho da de linfócitos (A); a distribuição de linfócitos, de acordo com as características da SSC da luz pelas células e identificação da subpopulação de linfócitos T pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD3-FITC, destacada a vermelho (B); a distribuição dos linfócitos T, segundo as características da SSC da luz pelas células e identificação dos linfócitos T <sub>H</sub> pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD4-APC, estando as células CD4 <sup>+</sup> , destacadas a verde, e as CD4 <sup>-</sup> (CD8 <sup>+</sup> ), destacadas a azul (C)).....	60
<b>Gráfico 7</b> – <i>Dot-plots</i> resultantes da análise do LCR apresentando: a distribuição de leucócitos, segundo as características da FSC e SSC da luz pelas células, com destaque da população de linfócitos a vermelho (A); a distribuição de linfócitos, de acordo com as características da SSC da luz pelas células e identificação da subpopulação de linfócitos T pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD3-FITC, destacada a vermelho (B); a distribuição dos linfócitos T, segundo as características da SSC da luz pelas células e identificação dos linfócitos T <sub>H</sub> pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD4-APC, estando as células CD4 <sup>+</sup> , destacadas a verde, e as CD4 <sup>-</sup> (CD8 <sup>+</sup> ), destacadas a azul (C)).....	61

## Abreviaturas

APC	– Alofococianina
ATP	– Adenosina trifosfato ( <i>Adenosine triphosphate</i> )
ATPases	– Adenosina trifosfatases ( <i>Adenosine triphosphatases</i> )
BHE	– Barreira hematoencefálica
BSLCR	– Barreira sangue-LCR
C5	– Quinta vértebra cervical
C6	– Sexta vértebra cervical
C7	– Sétima vértebra cervical
CD	– Grupos de diferenciação antigénicos ( <i>Cluster of Differentiation</i> )
CF	– Citometria de fluxo
Cl <sup>-</sup>	– Ião cloreto
CTCN	– Contagem total de células nucleadas
DDIV	– Doença discal intervertebral

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)  
 EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)  
 FITC – Isotiocianato de fluoresceína  
 FL – Fluorescência  
 FSC – Dispersão frontal (*Forward Scatter*)  
 G - Gauge  
 g/l – Grama por litro  
 $\text{HCO}_3^-$  – Ião bicarbonato  
 IFN- $\gamma$  – Interferão-gama  
 IgA – Imunoglobulina A  
 IgG – Imunoglobulina G  
 IgM – Imunoglobulina M  
 $\text{K}^+$  – Ião potássio  
 Kg – Quilograma  
 L3 – Terceira vértebra lombar  
 L4 – Quarta vértebra lombar  
 L5 – Quinta vértebra lombar  
 L6 – Sexta vértebra lombar  
 L7 – Sétima vértebra lombar  
 LCR – Líquido cefalorraquidiano  
 MARC – Meningite-arterite responsiva a corticosteroides  
 MEG – Meningoencefalite granulomatosa  
 mg/dl – Miligrama por decilitro  
 ml – Mililitro  
 ml/min – Mililitro por minuto  
 ml/min/g – Mililitro por minuto por grama  
 mm – Milímetro  
 MMP-9 – Metaloproteinase de matriz 9 (*Matrix metalloproteinase 9*)  
 MMPs – Metaloproteinases de matriz (*Matrix metalloproteinases*)  
 mPCR – PCR-multiplex  
 $\text{Na}^+$  – Ião sódio  
 PBS – Tampão fosfato-salino (*Phosphate buffered saline*)  
 PCR – Reação em cadeia pela polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)  
 RM – Ressonância magnética  
 RNA – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)  
 rpm – Rotações por minuto  
 RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*  
 RT-PCR – PCR com transcrição reversa (*Reverse Transcription-PCR*)  
 SNC – Sistema nervoso central  
 SSC – Dispersão lateral (*Side Scatter*)  
 T4 – Tiroxina, tetraiodotironina  
 $\text{T}_c$  – T citotóxicos  
 TC – Tomografia computadorizada  
 $\text{T}_H$  – T auxiliares (*T helper*)  
 TSH – Hormona estimulante da tiroide (*Thyroid-stimulating hormone*)  
 $\mu\text{l}$  – Microlitro

## **A. Introdução**

O líquido cefalorraquidiano (LCR) envolve o encéfalo e a medula espinhal, desempenhando um papel fundamental na proteção e manutenção do equilíbrio metabólico de todo o sistema nervoso central (SNC) (Cook & Levine, 2014; Johanson et al., 2008).

No âmbito das doenças que afetam o SNC em cães, os meios complementares de diagnóstico são limitados, sendo ainda um desafio estabelecer um diagnóstico definitivo em muitas ocasiões. Devido à dificuldade de acesso ao SNC pelos meios de diagnóstico utilizados em outros órgãos, o LCR, consequentemente, é utilizado para avaliar, ainda que de forma indireta, as doenças que afetam o parênquima do SNC, em particular as doenças inflamatórias (Duque, Parent, & Bienzle, 2002). As alterações do LCR, que são limitadas à celularidade e concentração de proteína, são indicadores relativamente sensíveis de doença no SNC mas raramente são específicos. Contudo, estas alterações, quando avaliadas em conjunto com os sinais clínicos, a história pregressa e os resultados imagiológicos, podem fornecer informações importantes para o estabelecimento do diagnóstico clínico de doenças do SNC (Cook & Levine, 2014; De Lorenzi & Mandara, 2016; Wood, Garosi, & Platt, 2012).

A citometria de fluxo (CF) tem sido largamente utilizada em investigação na medicina veterinária estando cada vez mais aplicada na clínica como meio complementar de diagnóstico, sobretudo, em casos de doenças hematológicas e mieloproliferativas. Esta técnica laboratorial permite identificar e isolar diferentes populações celulares com base na avaliação de diversas características, a partir de amostras heterogêneas (Corn, Chapman, & Pieczarka, 2014). No entanto, a análise de LCR por CF não tem sido muito referenciada em medicina veterinária, havendo pouca informação sobre o contributo que pode ter, em casos de doença que afetam o SNC, na determinação do diagnóstico definitivo ou exclusão de diagnósticos diferenciais.

## **B. Revisão bibliográfica**

### **1. Embriologia do SNC**

#### **1.1. Gastrulação e a indução do sistema nervoso**

No início do desenvolvimento embrionário, o blastocisto consiste em duas camadas planas de células, o epiblasto e o hipoblasto. O evento mais característico é a gastrulação, em que o blastocisto assume uma estrutura trilaminar (Carlson, 2009a; McGeady, Quinn, FitzPatrick, & Ryan, 2006a). As células do epiblasto invaginam provocando a deslocação do hipoblasto com a criação da camada germinativa embrionária inferior, a endoderme. A mesoderme forma-se



a partir de parte dessas células que repousam entre o epiblasto e a endoderme recém-criada (Sadler, 2012b). As células remanescentes no epiblasto formam então a camada germinativa embrionária superior, a ectoderme (Figura 1A) (Carlson, 2009a). As células que surgem de cada camada germinativa dão origem, posteriormente, a tecidos e órgãos específicos (McGeady, Quinn, FitzPatrick, & Ryan, 2006b).

Na extremidade cefálica da linha primitiva, uma acumulação bem definida de células, chamada de nó primitivo, funciona como indutor primário do futuro sistema nervoso. A formação do SNC provém da ectoderme, na qual a primeira resposta morfológica do embrião à indução neural é a proliferação do revestimento ectodérmico, dando origem à placa neural (Carlson, 2009a; McGeady et al., 2006a).

## **1.2. Neurulação e segmentação do tubo neural**

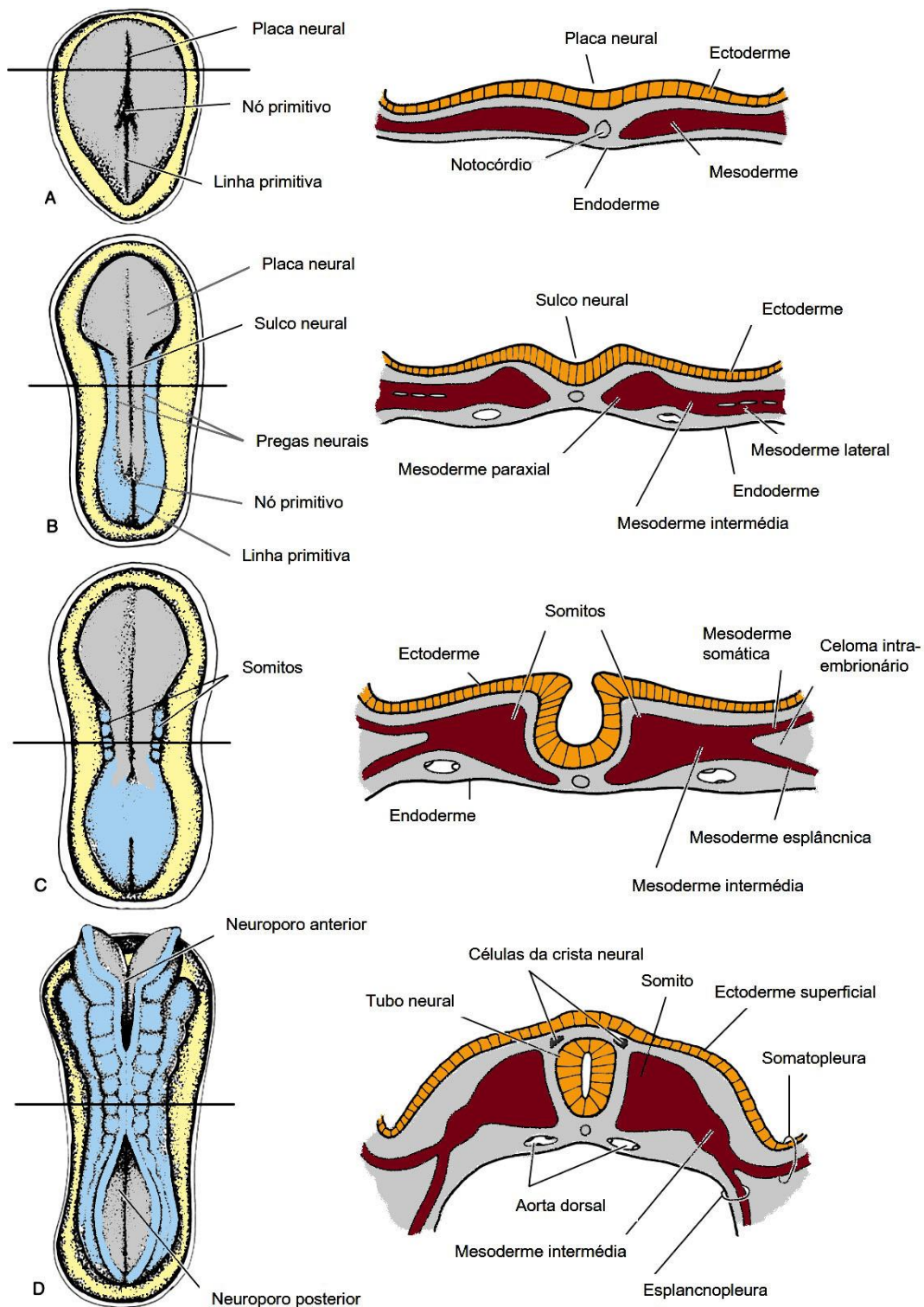
A neurulação é o processo que ocorre com a indução da placa neural e pelo qual se forma o tubo neural. Formam-se o sulco neural, pela depressão da região média, e as pregas neurais, pela elevação das bordas laterais da placa neural (Figura 1B/C), que se fundem, na linha média. A neurulação termina com o fechamento das extremidades do tubo neural, designadas por neuroporos (Figura 1C/D), ficando o SNC representado por uma estrutura tubular, com uma estreita porção caudal, a medula espinhal, e uma larga porção cefálica, o encéfalo, composta pelas vesículas encefálicas (Sadler, 2012a).

Durante a formação do tubo neural, a mesoderme adjacente forma uma coluna espessada de células, a mesoderme paraxial, que começa a ser organizada em segmentos, chamados de somitômeros. Em associação com a segmentação da placa neural, os somitômeros formam os neurômeros, na região da cabeça, e organizam-se em somitos, caudalmente, a partir da região occipital (Figura 1C/D) (Sadler, 2012a).

## **1.3. Linhagens celulares na histogênese do SNC**

A parede do tubo neural consiste em células neuroepiteliais que darão origem a neuroblastos, precursores dos neurônios, a glioblastos, precursores dos oligodendrócitos e astrócitos, e a células endodimárias que revestem os ventrículos cerebrais e o ducto central da medula espinhal (Carlson, 2009b). As células da micróglia, que têm atividade fagocítica, derivam da mesoderme (Carlson, 2009b; McGeady, Quinn, FitzPatrick, & Ryan, 2006c).

**Figura 1** – Vistas dorsais e transversais de embriões de mamíferos em desenvolvimento com representação da formação do tubo neural (adaptado de McGeady et al., 2006a).

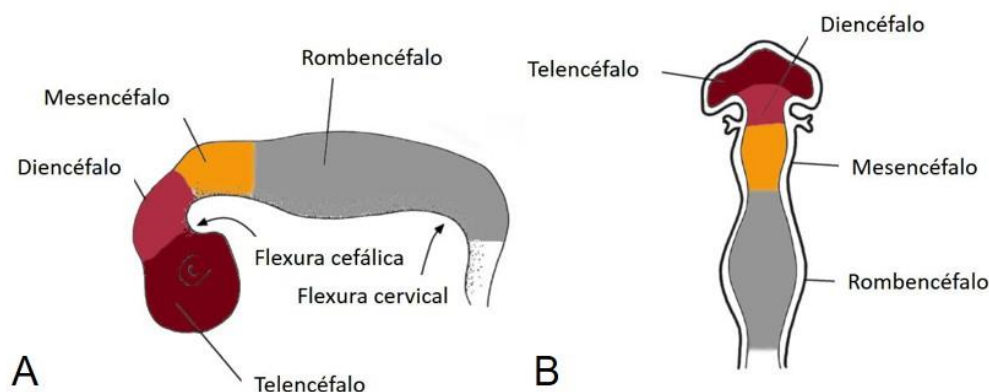


Mesoderme intermédia – estrutura de células lateral à mesoderme paraxial; Mesoderme lateral – estrutura de células lateral à mesoderme intermédia; Celoma intra-embrionário – espaço que divide a mesoderme lateral em dois folhetos, a mesoderme somática e a esplâncnica; Somatopleura – estrutura resultante da fusão da mesoderme somática (folheto externo) com a ectoderme; Esplanopleura – estrutura resultante da fusão da mesoderme esplâncnica (folheto interno) com a endoderme (McGeady et al., 2006a).

## 1.4. Vesículas encefálicas, meninges e sistema ventricular encefálico

Após a formação do tubo neural, a região do futuro encéfalo passa por uma série de subdivisões que resultam na formação de três vesículas encefálicas primárias: encéfalo anterior (prosencéfalo), encéfalo médio (mesencéfalo) e encéfalo posterior (rombencéfalo) (Figura 2). Mais tarde, o prosencéfalo subdivide-se em telencéfalo e diencéfalo, e o rombencéfalo subdivide-se em metencéfalo e mielencéfalo. Ao nível do mesencéfalo surge uma flexura cefálica proeminente, e, posteriormente, a separar o rombencéfalo da medula espinhal, uma flexura cervical (Figura 2A) (Carlson, 2009b).

**Figura 2** – Vista lateral (A) e secção (B) do encéfalo em desenvolvimento com identificação das flexuras, cefálica e cervical, e das vesículas encefálicas (adaptado de McGeady et al., 2006c).



No período fetal inicial, duas camadas de mesenquima surgem à volta do encéfalo e medula espinhal. Este tecido mesenquimatoso condensa-se formando as meninges. A camada externa, mais espessa, é de origem mesodérmica e forma a dura-máter (Carlson, 2009b). A aracnoide, camada média, e a pia-máter, camada interna, derivam da crista neural e, por cavitação, formam o espaço subaracnoide (Fletcher, 2013).

As cavidades das vesículas encefálicas e o lúmen do tubo neural persistem e subsequentemente dão origem ao sistema ventricular do cérebro e ao ducto central da medula espinhal, respetivamente. As cavidades laterais do telencéfalo denominam-se ventrículos laterais. A cavidade central do telencéfalo e a cavidade do diencéfalo formam o terceiro ventrículo. O lúmen central do mesencéfalo permanece estreito e forma o aqueduto mesencefálico, enquanto a cavidade expandida do rombencéfalo forma o quarto ventrículo (McGeady et al., 2006c).

## 2. Anatomohistologia do SNC

O tecido nervoso apresenta dois componentes principais: os neurónios, responsáveis pela receção, transmissão e processamento de estímulos, e as células da glia ou da neurógliã,

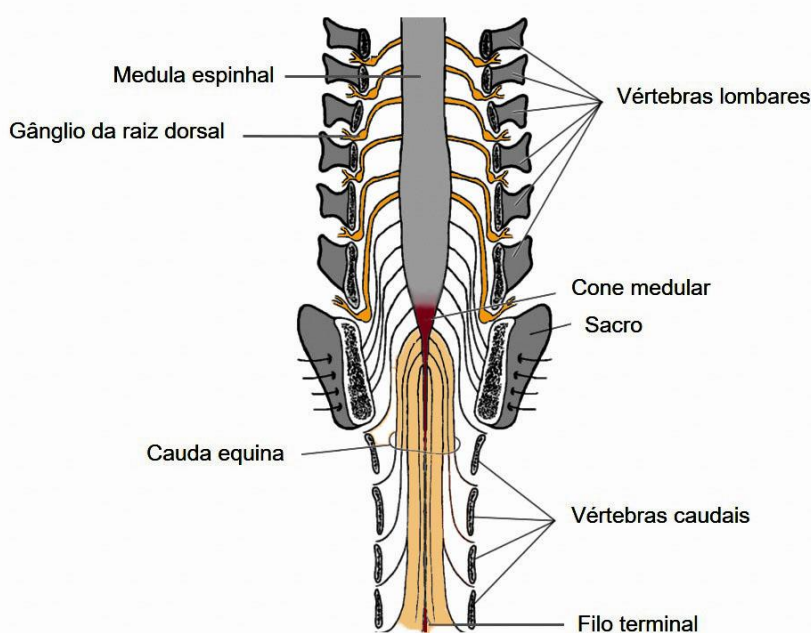
que, ao nível do SNC, compreendem os oligodendrócitos, os astrócitos, as células endimárias e as células da microglia (Junqueira & Carneiro, 2008).

O SNC compreende a medula espinhal e o encéfalo, os quais estão envolvidos pelas meninges (Fletcher, 2013). No SNC há uma segregação entre os corpos celulares dos neurónios e os seus prolongamentos, distinguindo-se duas porções, a substância branca e a substância cinzenta. A substância cinzenta é formada principalmente por corpos celulares, dendrites, a porção inicial não mielinizada dos axónios e células da glia. A substância branca contém apenas axónios mielinizados, oligodendrócitos e outras células da glia. A substância cinzenta predomina na superfície do telencéfalo e cerebelo, constituindo o córtex cerebral e o córtex cerebelar, enquanto a substância branca predomina nas regiões mais centrais (Junqueira & Carneiro, 2008). Na medula espinhal, por sua vez, a substância cinzenta ocupa uma posição central enquanto a substância branca se posiciona superficialmente (Fletcher, 2013).

## 2.1. Medula espinhal

A medula espinhal é a porção do SNC caudal ao cérebro e está contida no canal vertebral. A porção cranial da medula espinhal é contínua com a medula oblonga do cérebro ao nível do forâmen magno do crânio (Fletcher, 2013). A estreita extremidade caudal da medula espinhal é referida como cone medular. Caudalmente a este, o filo terminal liga o cone medular às vértebras caudais. A cauda equina inclui o cone medular juntamente com as raízes nervosas caudais, sacrais e lombares caudais que se estendem caudalmente no canal vertebral (Figura 3) (Evans & De Lahunta, 2010).

**Figura 3** – Secção longitudinal da extremidade caudal da coluna vertebral mostrando uma vista dorsal da cauda equina e do filo terminal (adaptado de McGeedy et al., 2006c).



## **2.2. Encéfalo**

O encéfalo é a parte rostral, mais larga, do SNC e está situado na cavidade craniana. Anatomicamente, o rombencéfalo, o mesencéfalo e o prosencéfalo são as três divisões principais. Funcionalmente, o encéfalo pode ser subdividido em prosencéfalo, tronco cerebral e cerebelo. Segundo esta divisão funcional, o tronco cerebral inclui a medula oblonga, uma área dilatada, a ponte, onde sobressaem fibras nervosas orientadas transversalmente, e o mesencéfalo. A substância cinzenta do tronco cerebral organiza-se em aglomerados de corpos celulares, funcionalmente semelhantes, chamados de núcleos (Thomson & Hahn, 2012). O metencéfalo divide-se na ponte, em posição ventral, e no cerebelo, em posição dorsal (McGeady et al., 2006c). O mesencéfalo é atravessado longitudinalmente por um ducto estreito, o aqueduto mesencefálico (Evans & De Lahunta, 2010). O diencéfalo pode ser dividido em cinco regiões: tálamo, metatálamo, hipotálamo, epitálamo e subtálamo. O tálamo é o maior componente, e está proximamente ligado ao córtex cerebral, por conexões recíprocas. O telencéfalo consiste em dois hemisférios cerebrais, separados pela fissura longitudinal, e suas interconexões (Fletcher & Beitz, 2013).

## **2.3. Meninges**

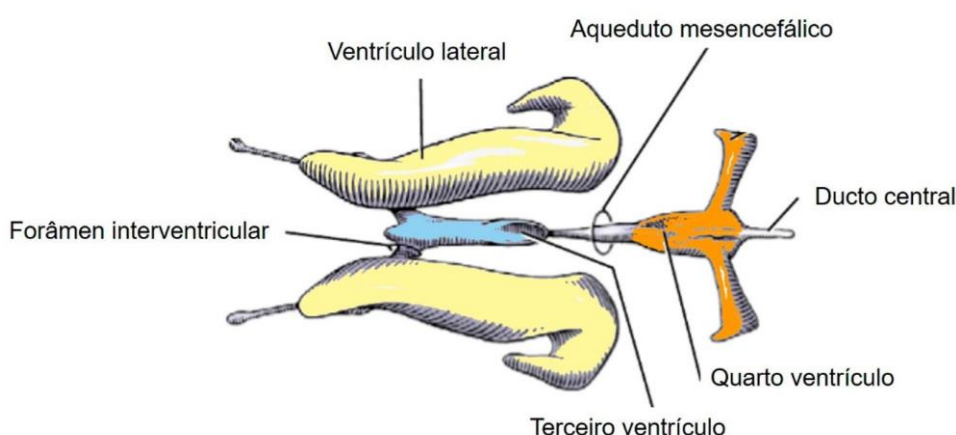
As meninges, dura-máter, aracnoide e pia-máter, são membranas que envolvem e protegem o encéfalo e a medula espinhal. A dura-máter é, também, referida como paquimeninge devido à sua forte natureza fibrosa. No forâmen magno, a dura-máter da medula espinhal é contínua com a dura-máter craniana. Na medula espinhal, esta meninge é separada do periósteo do canal vertebral pelo espaço epidural, que contém tecido adiposo e plexos venosos, exceto, ventralmente, ao nível do atlas e do eixo. A dura-máter craniana cobre o encéfalo e funciona como periósteo da cavidade craniana. Entre a dura-máter e a aracnoide existe um espaço subdural, que não é visível na ausência de doença. A aracnoide e a pia-máter constituem as leptomeninges, devido à sua fina e delicada natureza. Estas estão separadas pelo espaço subaracnoide que é maior em áreas conhecidas como cisternas. A mais importante é a cisterna cerebelomedular ou cisterna magna localizada onde o cerebelo se une à medula oblonga (Fletcher, 2013). A pia-máter é uma delgada membrana de tecido conjuntivo, altamente vascularizada, que está firmemente aderida à superfície externa da medula espinhal e do encéfalo (Junqueira & Carneiro, 2008).

## **2.4. Ventrículos cerebrais e epêndima**

O encéfalo tem um ventrículo lateral dentro de cada hemisfério cerebral, separados, na linha média, pelo septo telencefálico. Cada ventrículo lateral comunica, através de um forâmen interventricular, com o terceiro ventrículo, que se encontra envolvido pela adesão intertalâmica

do diencefalo. O aqueduto mesencefálico, cerebral, ou de Sylvius, conecta o quarto ventrículo com o terceiro ventrículo (Figura 4). O quarto ventrículo localiza-se no rombencéfalo, entre o cerebelo e a medula oblonga, e comunica tanto com o ducto central da medula espinhal, por continuidade, como com o espaço subaracnoide por aberturas laterais, os forâmenes de Luschka (Dellmann & McClure, 1986; Fletcher, 2013). As paredes dos ventrículos cerebrais, assim como o ducto central da medula espinhal, são revestidos pelo epêndima, um epitélio simples e ciliado (Del Bigio, 2010; Junqueira & Carneiro, 2008).

**Figura 4** – Vista dorsal do sistema ventricular do encéfalo do cão (adaptado de De Lahunta & Glass, 2009).



As células endoteliares, quando maduras, são caracterizadas morfologicamente por uma forma de cuboide a colunar e estão unidas, junto à superfície apical, por junções de adesão. A superfície é coberta por microvilosidades e a maioria das células têm um agrupamento central de longos cílios. Entre a superfície basal do epêndima e a rede subjacente de prolongamentos astrogliais, existe uma membrana basal (Del Bigio, 2010).

## 2.5. Plexos coróides

Numa região ao longo da parede de cada ventrículo, o tecido nervoso está ausente, havendo contacto da pia-máter com o epêndima. Esta combinação de tecidos, chamada de tela coróideia, encontra-se em parte do assoalho de cada ventrículo lateral e no teto do terceiro e quarto ventrículos. A tela coróideia em conjunto com plexos de capilares da pia-máter dá origem a plexos coróides. Cada plexo coróide projeta-se para dentro do respetivo ventrículo como uma banda de vilosidades agrupadas. O plexo coróide de cada ventrículo lateral é contínuo com o do terceiro ventrículo através do forâmen interventricular. Por sua vez, o plexo coróide do quarto ventrículo projeta-se para o espaço subaracnoide pelas aberturas laterais (Fletcher, 2013). O plexo coróide do quarto ventrículo é altamente lobulado e complexo, por oposição ao dos ventrículos laterais, que se reduzem a uma estrutura fina e ondulada. O do terceiro ventrículo possui uma estrutura intermédia (Strazielle & Gherzi-Egea, 2000).

Microscopicamente, os plexos coroides são recobertos por um epitélio simples, cúbico ou colunar baixo, seguido por uma membrana basal e uma espessa lâmina de tecido conjuntivo frouxo que envolve os capilares (Dellmann & McClure, 1986). As células epiteliais dos plexos coroides contêm um grande núcleo esférico central com até três nucléolos e citoplasma abundante (Millen & Rogers, 1956). Encontram-se mitocôndrias por todo o citoplasma sendo mais frequentes nas zonas apical e basal. O retículo endoplasmático rugoso e o aparelho de Golgi são vistos sobretudo nas zonas apical e perinuclear (Cancilla, Zimmerman, & Becker, 1966). O epêndima que reveste os ventrículos é contínuo com o epitélio dos plexos coroides sendo modificado a este nível, dado que, contrariamente às células ependimárias, na superfície apical das células epiteliais dos plexos coroides, as microvilosidades são frequentes e de maior comprimento, enquanto cílios isolados, ou agrupados, raramente são encontrados (Redzic & Segal, 2004; Wolburg & Paulus, 2010). Além disso, no polo apical da superfície lateral, células adjacentes são unidas por junções de oclusão (Del Bigio, 1995). Na superfície basal e no polo basal da superfície lateral, ocorrem interdigitações tanto entre as células epiteliais e a lâmina basal, bem como entre células epiteliais adjacentes (Cancilla et al., 1966; Maxwell & Pease, 1956). Devido às microvilosidades e às interdigitações referidas, verifica-se um aumento da área de superfície das membranas apical e basolateral, respetivamente. A parte central dos plexos coroides, separada do epitélio por uma lâmina basal contínua, contém os vasos sanguíneos envoltos por tecido conjuntivo frouxo. Os capilares dos plexos coroides são anormalmente grandes e fenestrados (Strazielle & Gherzi-Egea, 2000).

Faraci, Mayhan e Heistad (1989) verificaram que, sob este epitélio e respetiva lâmina basal, uma densa camada vascular proporciona um fluxo sanguíneo entre quatro a sete vezes maior que o do restante encéfalo. O plexo coroide é nutrido por artérias coroides que se originam dos ramos da artéria carótida interna, sendo drenado por uma rede de capilares fenestrados para veias coroides que se ligam à veia cerebral interna (Praetorius, 2007).

### **3. Fisiologia do LCR**

#### **3.1. Barreira hematoencefálica (BHE)**

A BHE é formada pelas células endoteliais dos capilares do encéfalo que apresentam um fenótipo particular caracterizado por junções intercelulares de oclusão e uma expressão polarizada de numerosos sistemas de transporte (Figura 5A) (Weiss, Miller, Cazaubon, & Couraud, 2009). Estas células endoteliais não são fenestradas e apresentam um elevado número de mitocôndrias, porém com raras vesículas de pinocitose (Cornford, Varesi, Hyman, Damian, & Raleigh, 1997; Gherzi-Egea, Leininger-muller, Cecchelli, & Fenstermacher, 1995; Junqueira & Carneiro, 2008; Oldendorf, Cornford, & Brown, 1977). O elevado conteúdo mitocondrial nestes capilares tem sido associado à manutenção dos gradientes iónicos dentro do SNC (Oldendorf et al., 1977).



A BHE permite o transporte de substâncias que se dissolvem facilmente em lípidos como o oxigénio e o dióxido de carbono. Moléculas como a glucose e aminoácidos, não lipossolúveis, são transferidas através da BHE por mecanismos transportadores específicos. A permeabilidade altamente seletiva dos capilares encefálicos permite a manutenção de um ambiente estável para os neurónios e células gliais do SNC, protegendo-o não só contra a toxicidade de alguns xenobióticos e agentes patogénicos, bem como contra flutuações nos níveis de hormonas, iões e neurotransmissores presentes na circulação (McGeedy et al., 2006c; Weiss et al., 2009). Em contrapartida, há um acesso limitado ao cérebro de muitos antibióticos e outros fármacos, particularmente os com baixa solubilidade em lípidos, ou os ligados a proteínas plasmáticas (Cunningham, 2004). Os vasos sanguíneos cerebrais são envoltos por uma lâmina basal rodeada por pericitos (Figura 5A), células gliais, especialmente astrócitos, e neurónios, estando este invólucro indiretamente envolvido no estabelecimento e manutenção da BHE (Weiss et al., 2009).

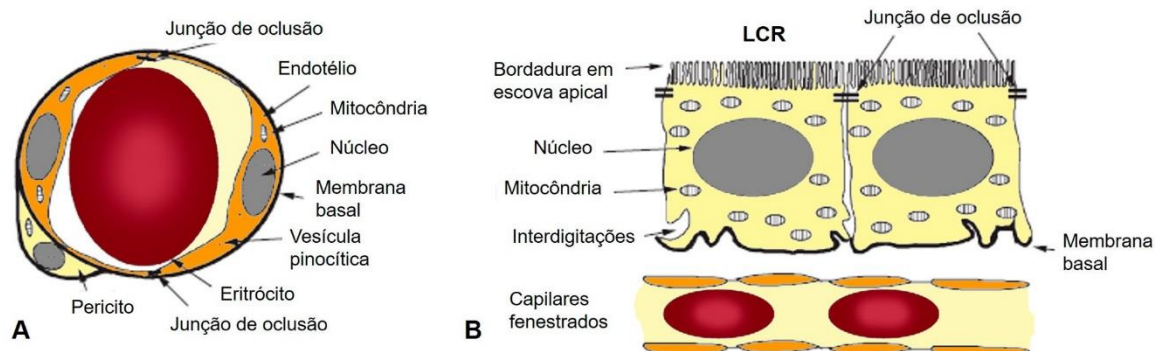
### **3.2. Barreira sangue-LCR (BSLCR)**

A BSLCR forma-se tanto nos plexos coroides como na membrana aracnoide, localizada entre o LCR do espaço subaracnoide e os vasos porosos da dura-máter (Gherzi-Egea et al., 1995; Johanson, 1988; Keep & Smith, 2011). Ao nível do plexo coroide, a BSLCR consiste no endotélio fenestrado dos capilares com a sua lâmina basal, tecido conjuntivo frouxo, uma membrana basal e uma camada única de células epiteliais. A barreira desta camada epitelial é definida pelas membranas plasmáticas e pelos espaços intercelulares laterais, equipados com junções de oclusão que previnem o fluxo paracelular e a difusão de substâncias do sangue para os ventrículos, permitindo apenas a passagem de pequenos iões e de água (Damkier, Brown, & Praetorius, 2010; Wolburg & Paulus, 2010). O endotélio coroide difere dos capilares da BHE pelo facto de conter muitas vesículas de pinocitose e fenestrações (Cornford et al., 1997). Além disso, apresenta entre um terço a metade do número de mitocôndrias presentes nas células endoteliais da BHE (Figura 5B) (Oldendorf et al., 1977). Quanto à membrana aracnoide, esta é composta por três a quatro camadas de células achatadas com numerosas mitocôndrias num volume relativamente grande de citoplasma, estando unidas por junções comunicantes na camada mais interna e por junções de oclusão nas camadas mais externas (Brightman, 1977; Johanson, 1988).

A BSLCR atua em conjunto com a BHE para assegurar a homeostasia da composição e volume do fluido intersticial encefálico. Uma semelhança entre estas barreiras reside na predominância da atividade de ATPases no lado apical dos plexos coroides e na membrana basal do endotélio cerebral, respetivamente (Johanson, 1988). As afeções do SNC são refletidas no LCR quando ocorre comprometimento da BHE, da BSLCR ou da interface do LCR com o cérebro e a medula espinhal (Wood et al., 2012).



**Figura 5** – Representação esquemática da morfologia da BHE (A) e da BSLCR (B) (adaptado de Smith, Johanson, & Keep, 2004).



### 3.3. Produção de LCR

O LCR é majoritariamente produzido pelo plexo coroide dos quatro ventrículos cerebrais (Figura 6A) (Dewey, da Costa, & Ducoté, 2016; Johanson et al., 2008; Skipor & Thiery, 2008). O revestimento ependimário do sistema ventricular, a membrana pio-glial externa da superfície cerebral e os vasos sanguíneos do espaço subaracnoide e pia-máter segregam também quantidades adicionais de LCR (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2006; Pollay & Curl, 1967). Abbott (2004) demonstrou a existência de um fluxo de fluido intersticial encefálico proveniente do endotélio dos capilares cerebrais, embora numa taxa reduzida. A taxa normal de produção de LCR varia entre 0,047 a 0,066 ml/min, em cães (Dewey et al., 2016). A sua velocidade de produção, fluxo, e absorção é suficientemente elevada para permitir a sua reposição várias vezes por dia (Cunningham, 2004).

A formação do LCR ocorre em duas fases: filtração passiva do plasma através do endotélio capilar coroide, seguida pela secreção ativa regulada pelo epitélio coroide (Orešković & Klarica, 2010; Pollay, 1975). A filtração é proporcional ao gradiente de pressão hidrostática entre o sangue e o fluido intersticial coroide. Um fluxo sanguíneo de 4 ml/min/g no plexo coroide é convertido em, aproximadamente, 0,4 ml/min/g de LCR em mamíferos (Johanson et al., 2008). A segunda fase envolve o transporte de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$ , induzido pela hidrólise de moléculas de ATP, do sangue para as células epiteliais do plexo coroide e destas para os ventrículos (Brown, Davies, Speake, & Millar, 2004; Johanson et al., 2008; Redzic & Segal, 2004). Este transporte unidirecional deve-se à polaridade do epitélio, que resulta da diferente distribuição das proteínas transportadoras de íons entre a membrana basolateral e a apical. Consequentemente, devido à hiperosmolaridade luminal, ocorre um transporte transcelular de água, facilitado por canais de aquaporinas, que equilibra osmoticamente o transporte de íons e fornece o meio para a circulação do LCR (Brown et al., 2004; Johanson et al., 2008; Orešković & Klarica, 2010; Praetorius, 2007).

### **3.4. Fluxo de LCR**

A partir do seu local de produção, o LCR tem uma via circulatória bem definida. O líquido produzido nos ventrículos laterais passa para o terceiro ventrículo pelo forâmen interventricular e do terceiro para o quarto ventrículo pelo aqueduto mesencefálico. A partir do quarto ventrículo, o líquido flui para o espaço subaracnoide, através das aberturas laterais (Fletcher, 2013; McGeady et al., 2006c). Uma vez no espaço subaracnoide, grande parte do líquido circunda a convexidade do cérebro e o restante envolve a medula espinhal (Cunningham, 2004). Uma pequena quantidade de LCR entra, ainda, no ducto central da medula espinhal (Figura 6A) (McGeady et al., 2006c). Tem sido demonstrado que os cílios das células endimárias movimentam-se de forma coordenada na direção do fluxo de LCR (Del Bigio, 2010).

O LCR flui a favor de um gradiente de pressão gerado por um fluxo de pulsações ativas, nas artérias do plexo coroide. Cada pulsação resulta do preenchimento com sangue e sucedente drenagem do plexo coroide, sendo transmitida pelo epitélio coroide ao LCR e forçando-o a sair dos ventrículos cerebrais (Bering Jr., 1955, 1962). O fluxo no espaço subaracnoide é variável. Durante a respiração, as alterações alternadas na pressão torácica e abdominal levam a que o LCR da medula espinhal se desloque cranialmente, durante a inspiração, e caudalmente, durante a expiração (Fletcher, 2013). Tem sido demonstrado, inclusivamente, que o fluxo de LCR é também influenciado pela sístole e diástole cardíacas e pelo gradiente de pressão hidrostática que existe entre o LCR e o sistema venoso (Bhadelia, Bogdan, & Wolpert, 1995; Mascalchi et al., 1988; Milhorat, 1975).

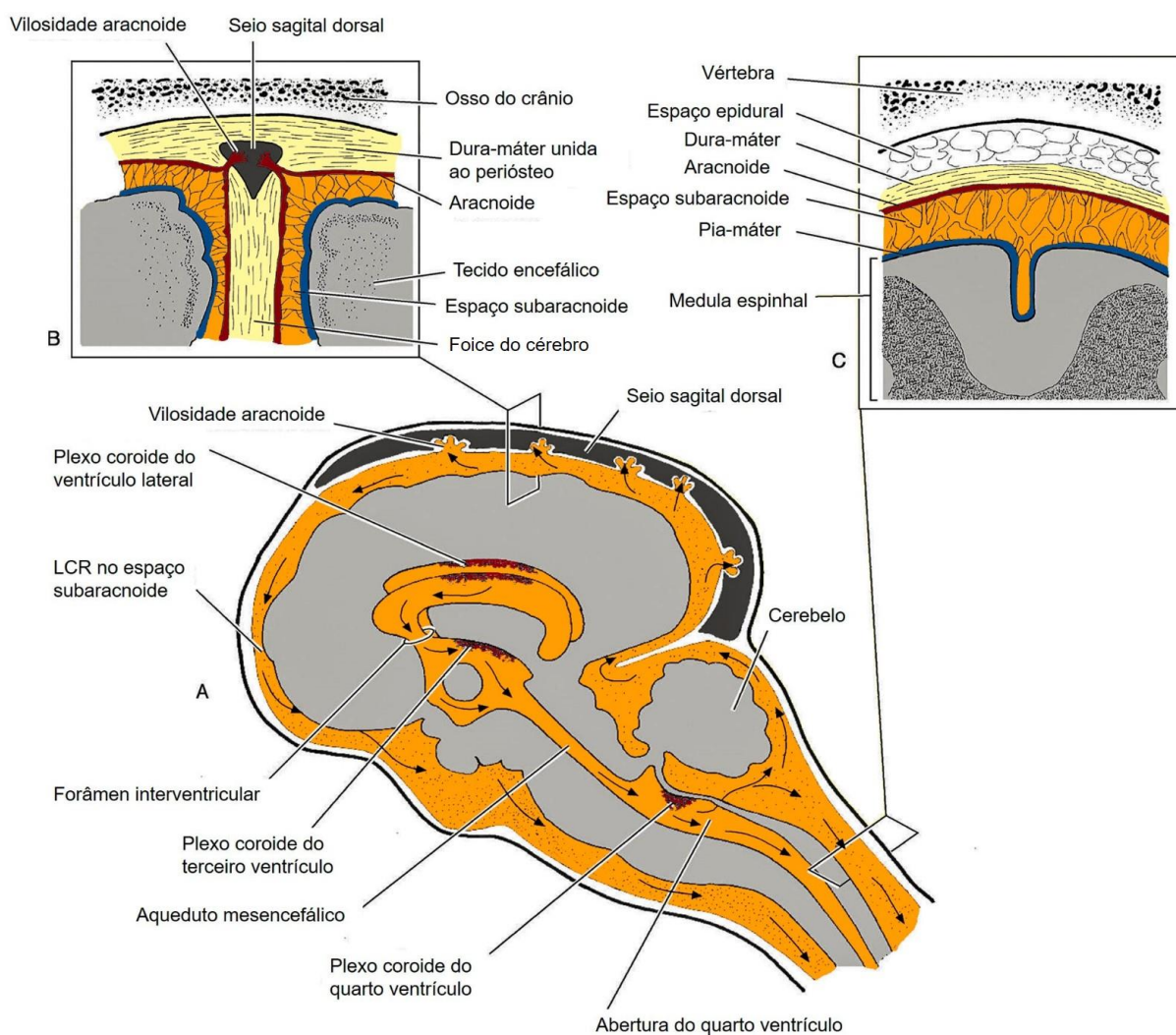
### **3.5. Absorção do LCR**

Sob condições normais o LCR retorna ao sistema venoso a uma taxa que se aproxima da taxa de produção, pelo que o volume de LCR permanece, aproximadamente, constante, apesar da sua produção contínua (Fletcher, 2013; McGeady et al., 2006c). Existem diversas vias de drenagem do LCR, destacando-se, ao nível do espaço subaracnoide três vias principais: 1) os seios venosos da dura-máter através de invaginações da parede, as vilosidades e granulações aracnoides; 2) os vasos linfáticos das raízes dos nervos cranianos e espinhais e 3) as vénulas do espaço subaracnoide (Thomson, Hahn, & Johnson, 2012).

As microvilosidades e as granulações aracnoides são projeções da aracnoide craniana para dentro dos seios venosos da dura-máter na convexidade do encéfalo (Figura 6B) (Johnston & Papaiconomou, 2002). Na vilosidade, o LCR é separado do sangue por fibroblastos achatados e células endoteliais. Cada vilosidade funciona como uma válvula reguladora unidirecional do fluxo do LCR para o seio venoso. Quando a pressão do LCR excede a venosa, a vilosidade expande e os espaços entre os processos celulares aumentam, permitindo a passagem de

líquido do espaço subaracnoide para o seio venoso. Quando a pressão no seio venoso excede a do LCR, as vilosidades colapsam, impedindo o retorno do líquido, do sangue para o espaço subaracnoide (Fletcher, 2013).

**Figura 6** – Representação esquemática do fluxo de LCR desde a sua produção até a sua absorção na região craniana (A), evidenciando a relação das meninges com as estruturas contíguas na região craniana (B) e na região espinal (C) (adaptado de McGeedy et al., 2006c).



Foixe do cérebro – camada interna da dura-máter craniana que se projeta por entre os hemisférios cerebrais. As setas indicam a direção do fluxo de LCR.

Ainda que o parênquima do SNC não contenha vasos linfáticos, está descrita a existência de uma ligação fisiológica entre o fluido intersticial encefálico, o LCR e a linfa extracraniana (Johnston & Papaiconomou, 2002). Zakharov et al. (2004) sugerem até que, na maioria dos mamíferos, as vilosidades aracnoides não são os locais de maior reabsorção de LCR. Johnston, Zakharov, Koh e Armstrong (2005) verificaram que o LCR parece se mover principalmente através da placa cribriforme para os vasos linfáticos associados à submucosa do epitélio olfatório e respiratório. O LCR é também drenado, para os vasos linfáticos

nervosos, a partir de recessos distais das meninges em volta das raízes nervosas, onde estas se continuam como nervos espinhais e cranianos (Fletcher, 2013). Não obstante, Johnston, Boulton e Flessner (2000) haviam desenvolvido a hipótese de que os vasos linfáticos extracranianos providenciam a rota primária para a drenagem do LCR até o nascimento, devido à ausência ou fraco desenvolvimento das projeções aracnoides, sendo que, na idade adulta, as vilosidades aracnoides e os vasos linfáticos partilham equitativamente a função de absorção do LCR. Inclusivamente, estudos sugerem que o LCR é transportado pela fissura coroide e reciclado através do plexo coroide (Maurizi, 2003). Por fim, o LCR pode, até certo ponto, reentrar na circulação através de vénulas do parênquima cerebral, o que representa uma grande área de superfície, mas com permeabilidade limitada a água e solutos (Praetorius, 2007).

### **3.6. Funções do LCR**

O LCR é um meio fisiológico para o encéfalo e medula espinhal, funcionando como um suporte mecânico, no sentido em que promove a fluidez destas estruturas. O peso efetivo do encéfalo é reduzido em cerca de 97% (Partington & Farmery, 2014). Deste modo, o LCR serve de amortecedor dos movimentos do tecido mole encefálico e espinhal relativamente ao crânio e canal vertebral, respetivamente (Praetorius, 2007; Vernau, Vernau, & Bailey, 2008).

Devido ao equilíbrio entre os seus níveis de produção e reabsorção, o LCR regula a pressão intracraniana, protegendo o encéfalo de flutuações nas pressões arterial e venosa central, associadas à postura, respiração e esforço (Praetorius, 2007; Vernau et al., 2008). O crânio é uma estrutura rígida de volume fixo, contendo três componentes: tecido encefálico, volume vascular e LCR intracranianos. Apenas o LCR e o sangue podem se deslocar de forma a manter constante o volume e a pressão intracranianos sem lesar o tecido encefálico. Deste modo, o volume de LCR e de sangue variam inversamente para manter a pressão intracraniana dentro de valores normais (Brumback, 1989).

O contacto íntimo do LCR com o tecido encefálico periventricular permite a regulação do ambiente químico do SNC, mediada por uma troca bidirecional de substâncias, por difusão e fluxo de massa (Johanson et al., 2004). Deste modo, o LCR é responsável pela remoção de metabolitos e toxinas, essencial para uma função neuronal eficiente, e pelo transporte intracerebral de substâncias biologicamente ativas como, por exemplo, hormonas sintetizadas no hipotálamo, para os seus locais de ação. Por um lado, a remoção de substâncias do LCR ventricular, que inclui aniões e catiões orgânicos, proteínas e péptidos, pode ocorrer ativamente por meio de transportadores da membrana apical do epitélio coroide para os capilares (Di Terlizzi & Platt, 2006; Johanson et al., 2008; Milhorat, 1975). Por outro lado, os metabolitos são difundidos para os ventrículos, por gradientes de concentração, e conduzidos do sistema ventricular ao espaço subaracnoide, por fluxo de massa, até chegarem aos locais

de drenagem nas interfaces aracnoide-linfática-venosa (Johanson, 2008; Smith et al., 2004). O facto de o LCR proporcionar um fluxo constante de líquido, quer no sistema ventricular, quer à superfície do encéfalo e medula espinhal, permite uma manutenção permanente do equilíbrio metabólico no SNC, assumindo a função dos vasos linfáticos, que estão ausentes (Di Terlizzi & Platt, 2006; Johanson et al., 2008; Milhorat, 1975). Dentro das substâncias removidas, incluem-se o excesso de iões  $K^+$ , produtos de desagregação das células epiteliais da superfície de revestimento, bactérias, vírus e detritos similares (Praetorius, 2007). Estes mecanismos funcionam em conjunto para assegurar a homeostasia do líquido (Johanson et al., 2008). As células endoteliais de mamíferos também possuem as características necessárias para a limpeza e destoxificação de uma grande variedade de substâncias no LCR (Del Bigio, 2010).

## **4. Colheita de LCR**

A colheita de LCR é recomendada como parte integrante do plano de diagnóstico de doenças do SNC de causa desconhecida, quando não for contraindicada. Uma correta interpretação dos resultados requiere conhecimento da apresentação clínica, do local de colheita e das considerações a ter em conta no manuseamento das amostras. A presença de artefactos ou contaminações pode interferir com uma interpretação apropriada a menos que sejam conhecidas as condições em que foi feita a colheita (De Lorenzi & Mandara, 2016).

### **4.1. Indicações**

A análise do LCR é um meio complementar de diagnóstico indicado em animais com sinais neurológicos referentes ao SNC (Levine & Levine, 2012; Wamsley & Alleman, 2004). O LCR deve ser colhido sempre que se suspeitar de uma doença inflamatória, infecciosa, traumática, neoplásica ou degenerativa do encéfalo ou da medula espinhal (Di Terlizzi & Platt, 2006). Técnicas especiais, como cultura bacteriana, identificação de microrganismos, titulação de anticorpos e testes de reação em cadeia pela polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), podem ser realizadas no LCR, podendo levar ao diagnóstico definitivo de doenças infecciosas do SNC (Taylor, 2010).

As encefalopatias, especialmente as de origem inflamatória, infecciosa ou não, têm indicação para a análise de LCR, uma vez que apresentam alterações características na sua celularidade e teor proteico (Dewey et al., 2016).

Qualquer mielopatia, seja focal, multifocal ou difusa, não diagnosticada nos exames imagiológicos, deve igualmente ser avaliada pela análise do LCR (Dewey et al., 2016). No entanto, a colheita deve ser feita antes da mielografia, dado que o contraste mielográfico produz uma ligeira resposta inflamatória local, alterando as características do LCR durante, pelo menos, três a cinco dias (Dewey et al., 2016; Marcos & Santos, 2011; Wamsley &

Alleman, 2004; Wood et al., 2012). Adicionalmente, em certos casos, a análise prévia do LCR pode até contraindicar a mielografia, como por exemplo, na meningite bacteriana (Marcos & Santos, 2011).

As radiculopatias, principalmente as de natureza inflamatória, causam alterações no LCR, devido ao envolvimento das raízes nervosas pelas meninges, sendo também indicação para a análise do LCR (Dewey et al., 2016).

## **4.2. Contraindicações e riscos**

As técnicas de colheita de LCR requerem anestesia geral, portanto, no caso de se tratar de um animal com risco anestésico inaceitável, a colheita está contraindicada (Dewey et al., 2016; Lorenz, Coates, & Kent, 2011a; Taylor, 2010).

O LCR não deve ser colhido caso se suspeite de uma pressão intracraniana elevada pois a sua remoção causa um gradiente de pressão que pode levar ao deslocamento caudal do cérebro ou cerebelo, resultando em hérnias cerebrais ou cerebelares. Tipicamente, ocorre uma hérnia do vérmis cerebelar e do tronco cerebral caudalmente pelo forâmen magno, provocando apneia e morte subsequente devido à compressão dos centros ou vias respiratórias medulares (Elias & Brown, 2008; Lorenz et al., 2011a). O aumento da pressão intracraniana pode estar associado a inflamação generalizada do encéfalo, hidrocefalia ativa ou descompensada, edema cerebral, traumatismo craniano agudo e grandes massas em expansão sejam elas neoplasias, abscessos, hematomas subdurais ou aneurismas (Cook & DeNicola, 1988; De Lorenzi & Mandara, 2016; Elias & Brown, 2008; Lorenz et al., 2011a; Taylor, 2010). Com o intuito de reduzir este risco, a tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) devem ser realizadas, antes da colheita, em animais com doença intracraniana. Se os testes imagiológicos revelarem a existência de hérnias cerebrais, desvio da linha média ou efeito de massa, a colheita pode ser estritamente contraindicada, dependendo da gravidade das alterações (Adamo, 2010; Elias & Brown, 2008; Levine & Levine, 2012). Caso a colheita não possa ser adiada, a pressão intracraniana pode ser medicamente diminuída com a administração de manitol, furosemida e dexametasona, 1 hora antes da anestesia, ou prednisolona nos 15 minutos anteriores (Marcos & Santos, 2011). À exceção destes casos, a colheita de LCR deve anteceder a administração de corticosteroides devido à potencial alteração na sua composição (De Lorenzi & Mandara, 2016).

De modo a reduzir o risco de infecção do SNC, por introdução de agentes infecciosos através da punção, a técnica de colheita deverá ser asséptica, com o local de colheita devidamente preparado, sendo contraindicada na presença de infecção local de tecidos moles (Cook & DeNicola, 1988; Wamsley & Alleman, 2004; Wood et al., 2012).

Outras contraindicações incluem: alterações congénitas, como malformações do forâmen magno ou suspeita de malformação neural na região da cisterna magna; fraturas,

deslocamentos ou subluxações da região occipital do crânio ou cervical cranial, resultando na instabilidade ou distorção do tronco cerebral ou da medula espinhal cervical; coagulopatia e suspeita de hemorragia intracraniana ativa (Crow, Walshaw, & Boyle, 2009; Di Terlizzi & Platt, 2009; Levine & Levine, 2012; Wamsley & Alleman, 2004).

Antes de proceder à colheita do LCR, a interpretação da história do animal, dos exames físico e neurológico e dos resultados da avaliação imagiológica é essencial para se aferir a existência ou não das contraindicações referidas (De Lorenzi & Mandara, 2016).

### **4.3. Complicações**

Certas complicações advêm do trauma iatrogénico no tronco cerebral e medula espinhal, inerente à técnica de punção utilizada para a colheita de LCR (Feliu-Pascual, Garosi, Dennis, & Platt, 2008; Wamsley & Alleman, 2004; Wood et al., 2012). Sinais clínicos e histopatológicos de trauma da medula espinhal após colheita de LCR por punção lombar, como hemorragia intraespinhal e degenerescência axonal, têm sido descritos em cães (Kishimoto, Yamada, Ueno, Kobayashi, & Wisner, 2004; Platt, Dennis, Murphy, & De Stefani, 2005). A penetração inadvertida do parênquima na região cerebelomedular pode levar a sinais de disfunção do tronco cerebral, que variam entre alterações vestibulares temporárias até cessação da respiração voluntária com morte consequente (Adamo, 2010; Dewey et al., 2016). A familiarização do clínico com a técnica é melhor adquirida por meio de uma prática inicial em cadáveres (De Lorenzi & Mandara, 2016).

A contaminação por sangue é a complicação mais comum na colheita de LCR, devendo-se, sobretudo, à penetração pela agulha de um ramo do plexo venoso vertebral (De Lorenzi & Mandara, 2016; Elias & Brown, 2008). Nestes casos, se surgir sangue total e abundante, a agulha deve ser, imediata mas lentamente, retirada e o procedimento repetido, com outra agulha estéril (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009). Não obstante, pode surgir, ocasionalmente, uma pequena quantidade de sangue, no momento da colheita, devido à rutura de um vaso da dura-máter, que deve diminuir com o maior gotejamento do LCR pela agulha. Nestes casos, as primeiras alíquotas devem ser descartadas e apenas o LCR menos contaminado deve ser preparado para a avaliação citológica (De Lahunta & Glass, 2009; Elias & Brown, 2008; Wood et al., 2012). Além da contaminação iatrogénica aquando do procedimento, a presença de sangue pode advir da existência de hemorragia por doença, não se verificando, nestes casos, alterações na quantidade de sangue à medida que o LCR é retirado (De Lahunta & Glass, 2009; Wood et al., 2012). Contudo, está descrito que contaminações do LCR por hemorragia até 10 000 células/ $\mu$ l não alteram significativamente a determinação da concentração de proteína nem do número de leucócitos no líquido (Taylor, 2010; Wood et al., 2012). Deste modo, a utilização destes parâmetros mantém-se viável para auxiliar no diagnóstico de doenças do SNC, mesmo com a presença de uma quantidade

moderada de eritrócitos (De Lorenzi & Mandara, 2016). Opinião distinta é manifestada por Doyle e Solano-Galego (2009) que verificaram que, em casos de contaminação por sangue no LCR de cães com contagem total de células nucleadas (CTCN) normal ( $\leq 5$  células/ $\mu$ l), a concentração de proteína, a percentagem de neutrófilos e a presença de eosinófilos foram significativamente afetadas, interferindo, nestes casos, na utilização destes parâmetros para a avaliação das alterações do SNC. Do mesmo estudo, concluiu-se igualmente que, no entanto, os macrófagos ativados e os linfócitos reativos não foram afetados, sugerindo que a presença deste tipo de células é um indicador mais específico de doença do SNC em animais com CTCN normal e contaminação por sangue.

Após três tentativas de colheita de LCR mal sucedidas, é recomendada a interrupção do procedimento de modo a diminuir a probabilidade de ocorrer uma penetração repetida da medula espinhal, evitando, assim, as complicações inerentes, incluindo a morte (De Lorenzi & Mandara, 2016).

#### **4.4. Técnicas de colheita**

##### **4.4.1. Generalidades**

Na colheita do LCR o animal deve ser submetido a anestesia geral e intubado com um tubo endotraqueal flexível, de modo a eliminar o desconforto da punção e evitar movimentos durante a colocação da agulha. Idealmente, a anestesia deve ser monitorizada para controlar os parâmetros vitais do animal e detetar possíveis alterações (De Lahunta & Glass, 2009; Dewey et al., 2016; Elias & Brown, 2008; Lorenz et al., 2011a).

As áreas a punccionar deverão ser preparadas, à semelhança de um procedimento cirúrgico, com tricotomia e limpeza assética. Por forma a manter a assepsia durante o procedimento, o clínico deve utilizar luvas estéreis no manuseamento da agulha (Dewey et al., 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Lorenz et al., 2011a).

O LCR pode ser colhido por punção a partir do espaço subaracnoide da cisterna magna ou do da região lombar (Wamsley & Alleman, 2004). Nos carnívoros domésticos, a cisterna magna é considerada a fonte mais segura para a colheita de LCR, pois o facto de ser mais profunda que a região lombar permite a obtenção de maiores volumes de LCR, sendo, para a maioria dos clínicos, o local mais fácil de realizar a colheita (Cunningham, 2004; Levine & Levine, 2012). Na maioria das espécies, a cauda equina termina próximo da sexta ou sétima vértebras lombares, deixando um pequeno espaço subaracnoide (Cunningham, 2004). Além disso, na região lombar o fluxo do LCR é mais lento e há maior probabilidade de contaminação iatrogénica por sangue (Levine & Levine, 2012; Taylor, 2010; Wood et al., 2012).

A colheita de LCR deve ser realizada próximo ao local da lesão ou caudalmente a este, devido ao facto de o LCR fluir predominantemente numa direção rostro-caudal (Dewey et al., 2016). Posto isto, o LCR obtido da cisterna magna é mais representativo em casos de doenças



cerebrais, enquanto o líquido colhido por punção lombar é mais útil na categorização da doença medular. Em casos de doença multifocal, é recomendada a colheita em ambos os locais (Dewey et al., 2016; Levine & Levine, 2012; Taylor, 2010). No entanto, não há diferenças significativas, do ponto de vista diagnóstico (Dewey et al., 2016; Taylor, 2010). Mesmo na ausência de doença, verificam-se diferenças analíticas entre os locais de colheita, tanto a nível da celularidade, que é maior na cisterna magna, como do teor em proteína, maior na região lombar (Marcos & Santos, 2011; Taylor, 2010).

Durante a colheita, o LCR não deve ser aspirado aplicando pressão negativa com uma seringa acoplada à base da agulha. A aspiração pode causar uma rápida diminuição da pressão do LCR, o que pode resultar em hemorragia ou hérnia cerebral e/ou cerebelar. Do mesmo modo, a remoção de um volume excessivo de LCR também potencia a ocorrência destas complicações (Wamsley & Alleman, 2004; Wood et al., 2012). Pode ser colhido, de forma segura, cerca de 1 ml de LCR por cada 5 kg de massa corporal (Dewey et al., 2016; Levine & Levine, 2012; Marcos & Santos, 2011; Wood et al., 2012). Esta quantidade é suficiente para uma completa análise bioquímica e citológica. Contudo, deve ser recolhido maior volume de LCR caso seja necessário realizar outros testes como culturas microbiológicas, eletroforese de proteínas ou análise por PCR (Marcos & Santos, 2011).

Além do referido, o equipamento necessário inclui tubos lisos e estéreis para a colheita e agulhas hipodérmicas espinhais com diâmetro compreendido entre 20G e 22G, adequado a cães grandes e pequenos, respetivamente, e de comprimento entre 40 mm e 90 mm, com estilete (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Lorenz et al., 2011a). Pequenas agulhas hipodérmicas (22G ou 25G), além de úteis em cães muito pequenos, são mais seguras se o operador for inexperiente no acesso à profundidade da cisterna magna e região lombar a partir da superfície cutânea (Di Terlizzi & Platt, 2009).

#### **4.4.2. Punção da cisterna magna**

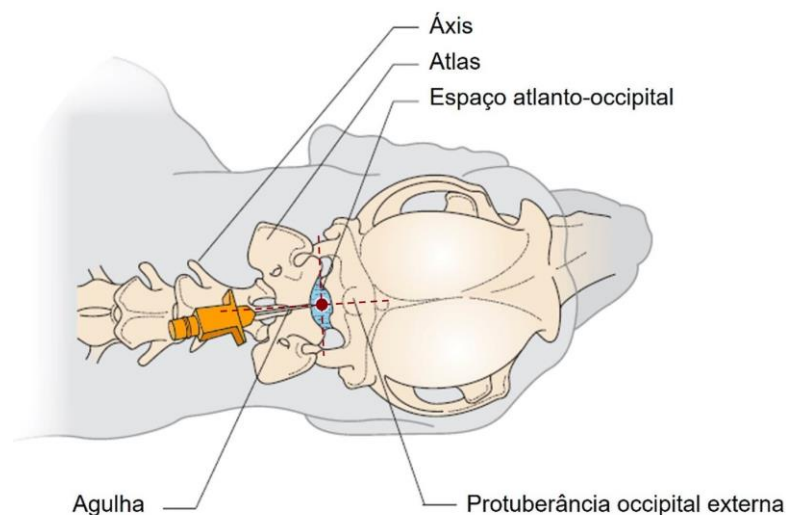
A colheita de LCR da cisterna magna é indicada para a classificação de lesões que afetam as meninges da cabeça e pescoço, quando os sinais clínicos envolvem convulsões, incoordenação geral, lateralização da cabeça ou andamento em círculos (De Lorenzi & Mandara, 2016).

A colheita a partir da cisterna magna é realizada, sobre uma mesa estável, com o animal em decúbito lateral, do lado correspondente à mão dominante do clínico responsável pelo procedimento, com a cabeça e o pescoço ao nível das bordas da mesa. O pescoço do animal é flexionado, aproximando tanto quanto possível dos 90°, de modo que o eixo mediano da cabeça fique perpendicular à coluna. O focinho deve estar ligeiramente elevado e impedido de qualquer movimento de rotação, para que a linha média fique paralela à superfície da mesa, facilitando a identificação dos pontos de referência e a inserção da agulha (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Levine & Levine, 2012; Taylor, 2010). O tubo

endotraqueal utilizado deve ser rígido o suficiente, para que, com a flexão do pescoço, não ocorra o colapso da traqueia e, conseqüentemente, a obstrução do fluxo de ar, durante o procedimento (Dewey et al., 2016; Elias & Brown, 2008; Wood et al., 2012). O *cuff* deve estar vazio no momento da flexão máxima do pescoço para reduzir o risco de trauma traqueal (Crow et al., 2009; Di Terlizzi & Platt, 2009). Ainda assim, a excessiva flexão do pescoço pode dobrar o tubo e obstruir a respiração, além de poder resultar num aumento da pressão intracraniana com risco de hérnia cerebral aumentado (De Lahunta & Glass, 2009; De Lorenzi & Mandara, 2016).

Com o animal sob anestesia geral, a tricotomia e preparação asséptica devem ser feitas ao nível da cabeça e pescoço, desde a margem anterior do pavilhão auricular até a terceira vértebra cervical e, lateralmente, entre as margens laterais dos pavilhões auriculares (De Lorenzi & Mandara, 2016). Os pontos de referência anatômicos para a colheita nesta cisterna incluem a protuberância occipital externa, a parte cranial do processo espinhoso do eixo e os processos transversos do atlas (Figura 7). Segundo a técnica mais utilizada, com o polegar e o terceiro dedo da mão não dominante, o clínico deve palpar as bordas craniais das asas do atlas e desenhar uma linha imaginária no seu limite mais cranial. O examinador pode então usar o seu indicador para palpar a protuberância occipital externa e desenhar uma segunda linha imaginária, caudalmente, até o processo espinhoso do eixo. A agulha deve ser inserida na interseção dessas duas linhas (Figura 7) (De Lorenzi & Mandara, 2016; Dewey et al., 2016; Elias & Brown, 2008; Levine & Levine, 2012; Lorenz et al., 2011a; Taylor, 2010). Em animais de pele espessa, a punção da pele primeiramente com uma agulha de 18G ou uma lâmina de bisturi pode ser útil para superar a sua resistência, prevenindo a contaminação com células e/ou detritos cutâneos (De Lorenzi & Mandara, 2016).

**Figura 7** – Determinação do local de inserção da agulha para a colheita de LCR a partir da cisterna magna, com representação dos pontos de referência anatômicos (adaptado de Wood et al., 2012).



Após a inserção, a agulha deve ser mantida perpendicular à superfície cutânea (De Lorenzi & Mandara, 2016; Taylor, 2010). O bisel da agulha é direcionado cranialmente, podendo aumentar a taxa de fluxo de LCR (De Lorenzi & Mandara, 2016; Levine & Levine, 2012). Avança-se a agulha gradualmente, 1 a 2 mm de cada vez, e, periodicamente, enquanto a mão não dominante, apoiada na coluna, estabiliza a agulha com o polegar e o dedo indicador, o estilete é retirado, com a outra mão, para determinar se o LCR está presente (De Lorenzi & Mandara, 2016; Elias & Brown, 2008; Taylor, 2010). Ocasionalmente, uma súbita perda de resistência pode ser sentida assim que a agulha entra no espaço subaracnoide, mas pode não ser detectada em todos os casos, particularmente em cães pequenos, dado que o espaço subaracnoide geralmente é bastante próximo da superfície cutânea (De Lahunta & Glass, 2009; De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Levine & Levine, 2012). O estilete da agulha é, então, removido neste ponto e o líquido pode fluir para os tubos de colheita (Di Terlizzi & Platt, 2009; Levine & Levine, 2012; Lorenz et al., 2011a). A amostra de LCR deve ser dividida em duas ou três alíquotas colhidas em tubos separadamente. A colheita inicial pode conter eritrócitos do trauma, todavia as alíquotas subsequentes, nestes casos, são desprovidas desta contaminação (Lorenz et al., 2011a). O LCR pode ser colhido deixando-o pingar, diretamente da agulha para o tubo de colheita ou por sucção suave, através de uma seringa, à medida que as gotas atingem a base da agulha (De Lorenzi & Mandara, 2016). A compressão simultânea da veia jugular pode acelerar o fluxo, porém aumenta, transitoriamente, a pressão intracraniana. Após a colheita, a agulha deve ser retirada lentamente sem o estilete (De Lorenzi & Mandara, 2016; Elias & Brown, 2008).

Se o osso for atingido, o clínico deve conseguir identificar de que osso se trata, retirar ligeiramente a agulha e redirecionar caudalmente, caso esteja ao nível do osso occipital, ou cranialmente, se estiver ao nível do atlas (De Lahunta & Glass, 2009; Elias & Brown, 2008). Pode ser mais apropriado, no entanto, retirar a agulha por completo, determinar novamente os pontos de referência e repetir o procedimento (Elias & Brown, 2008; Taylor, 2010).

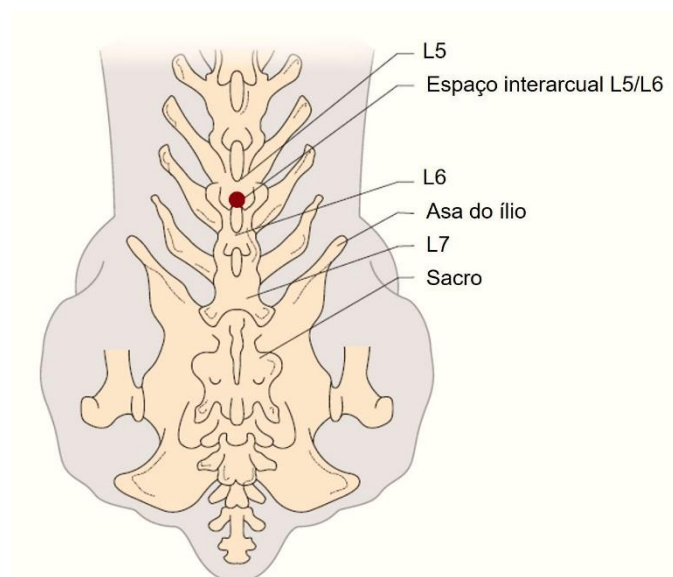
#### **4.4.3. Punção da região lombar**

Embora menos frequente na prática clínica, a colheita de LCR da região lombar é indicada em casos de suspeita de lesões nos segmentos cervical caudal e toracolombar da medula espinhal (Crow et al., 2009). O animal é colocado em decúbito lateral, com a flexão da coluna vertebral lombar, flexionando os membros pélvicos cranialmente, até o abdômen ventral, permitindo uma maior abertura do espaço interarcual (Crow et al., 2009; Dewey et al., 2016; Levine & Levine, 2012). Podem ser colocadas almofadas de espuma entre os membros e sob a região lombar para a obtenção de uma posição lateral mais exata (Dewey et al., 2016; Taylor, 2010). A tricotomia e preparação asséptica são feitas na região lombossagrada dorsal, desde a L3 até metade do sacro, estendendo-se lateralmente até as asas do ílio (De Lorenzi & Mandara, 2016). Os pontos anatómicos de referência são os processos espinhosos e

transversos das vértebras lombares, as cristas ilíacas e os músculos lombares dorsais (Crow et al., 2009).

A agulha é inserida no espaço interarcual L4 – L5, nos cães grandes, e L5 – L6, nos cães mais pequenos (Figura 8), paralela ao processo espinhoso de L5 ou L6, respetivamente (Dewey et al., 2016; Levine & Levine, 2012; Wood et al., 2012). Nestes espaços, a medula espinhal afunila-se no cone medular rodeado pela cauda equina (Di Terlizzi & Platt, 2009). O LCR pode ser colhido do espaço subaracnoide dorsal ou a agulha pode atravessar as estruturas nervosas até o chão do canal vertebral para a colheita no espaço subaracnoide ventral (De Lorenzi & Mandara, 2016). Se a agulha atingir osso, deve ser movida poucos milímetros, cranial ou caudalmente (Di Terlizzi & Platt, 2009). A cauda do animal e os membros pélvicos podem se contrair, após a inserção da agulha, devido à estimulação das raízes nervosas (Di Terlizzi & Platt, 2009; Taylor, 2010). O estilete é então removido e a agulha pode ser cuidadosamente retirada poucos milímetros para permitir o fluxo do líquido (De Lorenzi & Mandara, 2016). Após a remoção do estilete, o LCR é colhido do mesmo modo que na cisterna magna (Crow et al., 2009). Se não surgir líquido, uma rotação e/ou uma retirada muito ligeira da agulha pode incitar o fluxo de LCR (Di Terlizzi & Platt, 2009).

**Figura 8** – Determinação do local de inserção da agulha para a colheita de LCR na região lombar, com representação dos pontos de referência anatómicos para cães pequenos (adaptado de Wood et al., 2012).



L5 – Quinta vértebra lombar; L6 – Sexta vértebra lombar; L7 – Sétima vértebra lombar

#### 4.5. Processamento e acondicionamento da amostra

O líquido deverá ser colhido para um tubo estéril, de preferência sem ácido etilenodiaminotetracético (EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*), porque este pode causar falsas elevações na concentração de proteína e diminuições na concentração de células em pequenas amostras (Dewey et al., 2016; Levine & Levine, 2012; Taylor, 2010). Uma vez que

o EDTA é bactericida, pode, também, interferir com os resultados de culturas de LCR em casos de infecções bacterianas do SNC. No entanto, o EDTA pode ajudar a preservar a morfologia celular e pode prevenir a coagulação nos casos em que o LCR se encontra muito hemorrágico (Dewey et al., 2016; Taylor, 2010). Os tubos com EDTA são, então, reservados para as amostras que se destinem à análise por PCR. Algumas gotas devem ser guardadas em tubos lisos separados para cultura e sensibilidade de microrganismos se houver suspeita de infecção e para estudos virológicos e imunológicos se for necessário (Di Terlizzi & Platt, 2009).

As contagens celulares e a preparação das lâminas devem estar completas até 30 a 60 minutos após a colheita. Depois deste período, há diminuição do número de células nucleadas e distorção significativa da morfologia celular (Fry, Vernau, Kass, & Vernau, 2006; Nghiem & Schatzberg, 2010; Marcos & Santos, 2011; Rakich & Lamiter, 2011; Taylor, 2010). Fry et al. (2006), detectaram reduções na concentração diferencial de células nucleadas no LCR, com o passar do tempo após a colheita, sendo mais pronunciadas nas células mononucleares do que nos neutrófilos. O referido estudo também evidenciou a ocorrência de alterações na morfologia celular 24 horas após a colheita. Quanto aos eosinófilos, a estrutura celular manteve-se inalterada após 48 horas de armazenamento. Esta fragilidade pode dever-se à hipotonicidade do LCR e às suas concentrações caracteristicamente baixas de proteína e de lípidos, cuja função passa por estabilizar as membranas celulares dos leucócitos (Rakich & Lamiter, 2011; Steele, Marmer, O'Brien, Tyson, & Steele, 1986). Amostras com maiores concentrações de proteína estão menos suscetíveis de deterioração que as com menores concentrações (Fry et al., 2006; Wood et al., 2012).

Se o LCR não puder ser processado nos 60 minutos após a colheita, este deve ser dividido em dois tubos: um sem adição de fixador, para avaliação bioquímica e CTCN, e outro com adição de fixador, indicado para a contagem diferencial de células e para a avaliação da morfologia celular (Bienzle, McDonnell, & Stanton, 2000; Marcos & Santos, 2011; Wood et al., 2012). A refrigeração da amostra também ajuda a retardar e a minimizar a degeneração celular (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010; Taylor, 2010). Bienzle et al. (2000) recomendam a utilização de soro autólogo a 10% para uma melhor preservação celular. É de salientar que a adição do soro do próprio animal além de requerer uma centrifugação eficaz do sangue (para não contaminar o LCR com eritrócitos), pode conter um teor proteico variável (por exemplo, em animais com hipoproteinémia), o que afetaria a análise da proteína (Marcos & Santos, 2011; Taylor, 2010; Wood et al., 2012). Contudo, permite a obtenção de resultados confiáveis para as análises citológicas até entre 24 a 48 horas após a colheita e tem a vantagem de estar facilmente disponível (Marcos & Santos, 2011; Rakich & Lamiter, 2011; Taylor, 2010). Fry et al. (2006) adicionaram soro bovino fetal a 20% ou hetamido numa proporção de 1:1 a amostras de LCR e verificaram que, após 48 horas, havia maior estabilidade celular. Todavia, no que à concentração da proteína do

LCR diz respeito, demonstraram que o hetamido não interfere na sua medição. Já o soro bovino fetal, à semelhança do soro autólogo, altera os valores da concentração da proteína por conter proteínas séricas na sua constituição. A utilização destes estabilizantes pressupõe que os efeitos da diluição sejam tidos em consideração no cálculo das contagens celulares (De Lorenzi & Mandara, 2016; Fry et al., 2006; Rakich & Lamiter, 2011; Wood et al., 2012). A adição de álcool a 50%, entre outros conservantes, prejudica a morfologia das células, devendo-se restringir o seu uso para casos excepcionais (Marcos & Santos, 2011). Como alternativa, a adição de uma gota de formalina tamponada a 10% pode ser adicionada a cada 1 a 2 ml de LCR para preservar as contagens celulares e as características citológicas sem afetar a mensuração da concentração de proteína (De Lorenzi & Mandara, 2016; Taylor, 2010). As amostras devem ser, idealmente, refrigeradas a 4°C, quando são enviadas para o laboratório, e explicitamente rotuladas para que os efeitos da adição de agentes estabilizadores sejam tidos em consideração (Wood et al., 2012).

## **5. Análise de LCR**

A análise de LCR é muito sensível, porém inespecífica, pois deteta com frequência alterações no líquido, oferecendo ao clínico a indicação da existência ou não de doença envolvendo o SNC, ainda que raramente se obtenha o diagnóstico definitivo exclusivamente por esta avaliação (Dewey et al., 2016; Elias & Brown, 2008; Marcos & Santos, 2011). Por esta razão, é essencial preceder a análise de LCR de um exame clínico e neurológico completo, com a correta interpretação dos sinais e estabelecimento de diagnósticos diferenciais. Dentro dos grandes grupos de processos patológicos que apresentam sinais neurológicos, as lesões neoplásicas, traumáticas, vasculares, infecciosas e inflamatórias causam alterações do LCR. Contudo, as situações de doença congênita, degenerativa, metabólica, nutricional, tóxica ou idiopática geralmente não causam alterações, podendo a análise de LCR ser válida para exclusão de diagnósticos (Abate, Bollo, Lotti, & Bo, 1998; Elias & Brown, 2008; Marcos & Santos, 2011). Podem ser encontrados na análise do LCR microrganismos virais, bacterianos, protozoários e fúngicos, sendo estes últimos mais consistentemente identificados (Abate et al., 1998). Uma análise de rotina de LCR inclui: 1) uma avaliação macroscópica, que incide sobre a coloração e turvação do LCR; 2) uma análise quantitativa, que engloba a contagem de eritrócitos, a CTCN e a concentração de proteína total; 3) e uma avaliação citológica microscópica que inclui as contagens diferenciais de leucócitos (De Lorenzi & Mandara, 2016; Wood et al., 2012). Se não for possível realizar todos os testes devido a um volume de LCR insuficiente, o clínico deve classificá-los e ordená-los de acordo com a relevância e prioridade quando submete as amostras para o laboratório, devendo atribuir especial importância às contagens diferenciais das células (De Lorenzi & Mandara, 2016).

## **5.1. Avaliação macroscópica**

### **5.1.1. Coloração**

Após a colheita, o LCR deve ser examinado macroscopicamente. No estado normal, o LCR é um transudado límpido e incolor, que não coagula (Elias & Brown, 2008; Marcos & Santos, 2011; Rakich & Lamiter, 2011; Taylor, 2010). No entanto, este aspeto pode se alterar com uma presença adicional de células ou produtos de degradação celular (Wamsley & Alleman, 2004). Uma coloração rosa ou avermelhada é indicativa da presença de sangue seja por contaminação iatrogénica ou hemorragia patológica (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Rakich & Lamiter, 2011). Nestes casos, pode-se recorrer à centrifugação da amostra, a fim de aferir a origem do sangue (De Lahunta & Glass, 2009; Wamsley & Alleman, 2004). Se, após centrifugação, surgir uma camada celular na base do tubo com um sobrenadante incolor, a coloração era devida à presença de eritrócitos intactos provenientes de uma contaminação iatrogénica de sangue periférico, causada pela punção na colheita, ou de uma hemorragia recente no espaço subaracnoide (Cook & DeNicola, 1988; De Lahunta & Glass, 2009; Marcos & Santos, 2011; Rakich & Lamiter, 2011; Wamsley & Alleman, 2004). As causas de hemorragia ao nível do espaço subaracnoide incluem trauma, hérnias discais, êmbolos fibrocartilagíneos, doença vascular primária ou lesões vasculares secundárias a inflamação ou neoplasia (Elias & Brown, 2008; Levine & Levine, 2012).

Se surgir um sobrenadante amarelado ou amarelo-acastanhado, referido como xantocromia, é provável que se trate de uma hemorragia crónica ou que esta tenha ocorrido há pelo menos 10 horas antes da colheita de LCR (Dewey et al., 2016; Nghiem & Schatzberg, 2010). A xantocromia indica a presença de bilirrubina, derivada da degradação da hemoglobina secundária à destruição endógena dos eritrócitos (Cook & DeNicola, 1988; De Lahunta & Glass, 2009; Levine & Levine, 2012; Rakich & Lamiter, 2011; Wamsley & Alleman, 2004). A bilirrubina pode também estar aumentada na presença de elevações da proteína do LCR, alterações significativas na integridade da BHE/BSLCR e em casos de hiperbilirrubinémia (Bakr, Silva, Cramb, Flint, & Foroughi, 2016; Nagy et al., 2013; Wamsley & Alleman, 2004). A xantocromia pode persistir durante duas a quatro semanas após a hemorragia ter atingido o espaço subaracnoide, porém geralmente retornam à normalidade dentro de quatro a oito dias (Dewey et al., 2016). Um LCR xantocrómico está associado a hemorragias causadas por trauma, vasculite, inflamação grave, extrusão discal ou por neoplasia necrótica ou erosiva (De Lorenzi & Mandara, 2016). Além da xantocromia, evidências microscópicas de eritrofagocitose ou de presença de hemossiderófagos também sugerem a ocorrência de uma hemorragia patológica no SNC ou espaço subaracnoide (Chrisman, 1992; De Lorenzi & Mandara, 2016; Levine & Levine, 2012; Rakich & Lamiter, 2011; Wood et al., 2012). Não obstante, pequenas hemorragias iatrogénicas são comuns e não interferem significativamente com a interpretação da avaliação do LCR (De Lahunta & Glass, 2009; Taylor, 2010).

Embora menos frequentemente, pode surgir uma coloração amarelo-esverdeada, que pode ser causada por uma CTCN significativamente aumentada, característica de inflamação purulenta ou infiltração neoplásica. Além da referida, está igualmente descrita uma coloração acinzentada que ocorre na presença de grânulos de melanina ou de melanócitos, raramente encontrados no LCR (Wamsley & Alleman, 2004).

### **5.1.2. Turvação**

O LCR normal é translúcido. A turvação aumenta devido à presença de partículas suspensas no líquido, sendo o seu aumento característico de elevações da celularidade da amostra (Di Terlizzi & Platt, 2009; Rakich & Lamiter, 2011). Para que se detete uma ligeira turvação no LCR, tendo em conta diversos autores, é necessário que estejam presentes contagens acima das 500 células/ $\mu$ l ou, pelo menos, 200 leucócitos/ $\mu$ l ou 400 - 700 eritrócitos/ $\mu$ l, indicativos de inflamação grave ou hemorragia significativa (De Lorenzi & Mandara, 2016; Dewey et al., 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Levine & Levine, 2012; Nghiem & Schatzberg, 2010; Marcos & Santos, 2011; Rakich & Lamiter, 2011; Wood et al., 2012). Ocasionalmente, o aumento da turvação pode resultar de um aumento dos níveis de proteína, que, quando significativamente elevados, podem também aumentar a viscosidade do líquido, levando à sua coagulação, mesmo que seja raro (Dewey et al., 2016; Nghiem & Schatzberg, 2010). A presença de bactérias, fungos ou aspirados de gordura também contribuem para a turvação do LCR (Rakich & Lamiter, 2011).

## **5.2. Análise quantitativa**

### **5.2.1. Parâmetros bioquímicos**

#### **5.2.1.1. Concentração da proteína total**

A quantidade de proteína do LCR é muito baixa, sendo aproximadamente 0,5% da do plasma sanguíneo, pelo que alterações clinicamente significativas podem não ser detetáveis pela refratometria convencional (De Lorenzi & Mandara, 2016; Fishman, Ransohoff, & Osserman, 1958; Levine & Levine, 2012; Marcos & Santos, 2011; Wood et al., 2012). Nos carnívoros domésticos, a concentração de proteína total aumenta, rostro-caudalmente, ao longo do neuroeixo, daí que o LCR colhido da região lombar apresente maior concentração proteica que o colhido da cisterna magna (Wamsley & Alleman, 2004; Wood et al., 2012). Estudos sugerem que este aumento na concentração proteica poderá dever-se, em parte, ao facto de haver uma maior permeabilidade da BSLCR e uma menor velocidade de circulação do LCR, com acumulação subsequente de proteína, ao nível da região lombar (Di Terlizzi & Platt, 2009; Fishman et al., 1958). Os valores de referência, em pequenos animais, para a concentração proteica são <25 mg/dl e <45 mg/dl, no LCR colhido da cisterna magna e da região lombar, respetivamente, podendo variar de acordo com o laboratório e o método utilizado (Chrisman,



1992; De Lorenzi & Mandara, 2016; Dewey et al., 2016; Nghiem & Schatzberg, 2010; Wood et al., 2012).

A maioria das proteínas normalmente presentes no LCR provém do plasma (Di Terlizzi & Platt, 2009; Reiber, 2003; Vernau et al., 2008). As exceções incluem proteínas produzidas nos plexos coróides, como a transtirretina, a transferrina e a proteína de ligação ao retinol, e, ainda, vestígios de proteínas de produção intratecal<sup>1</sup>, como as  $\beta$ - e  $\gamma$ -globulinas e a proteína básica da mielina, entre outras (Forterre, Raila, Forterre, Brunnberg, & Schweigert, 2006; Vernau et al., 2008).

O aumento da concentração de proteína no LCR é um indicador sensível de doença do SNC, porém, é a alteração menos específica que se pode observar numa análise de LCR, acompanhando os aumentos das contagens de leucócitos, praticamente sempre que estes acontecem (Wood et al., 2012). Os valores de proteína podem se encontrar elevados na presença de contaminação sanguínea, alterações da BHE/BSLCR com extravasamento do plasma, necrose local, interrupção do fluxo normal de LCR e produção intratecal aumentada (De Lorenzi & Mandara, 2016; Levine & Levine, 2012; Nghiem & Schatzberg, 2010; Marcos & Santos, 2011; Taylor, 2010; Vernau et al., 2008; Wood et al., 2012). Elevações na proteína total do LCR podem ser encontradas em doenças degenerativas, anómalas, metabólicas, neoplásicas, infecciosas/inflamatórias, traumáticas, vasculares e tóxicas (Nghiem & Schatzberg, 2010).

A determinação da concentração da proteína total é um componente integral da análise do LCR canino. Diversos testes foram desenvolvidos para avaliar alterações no teor proteico do LCR de forma qualitativa ou semiquantitativa (Riond, Steffen, Schmied, Hofmann-Lehmann, & Lutz, 2014). No LCR estão presentes, sobretudo, dois tipos de proteínas, as albuminas e as globulinas, que são detetadas por métodos diferentes (Marcos & Santos, 2011). A utilização de uma tira de análise urinária permite estimar, e não quantificar, as concentrações de proteína do LCR a partir de 0,3 g/l (Tabela 1) (Behr, Trumel, Palanché, & Braun, 2003; Riond et al., 2014). No entanto, é um método que apresenta sensibilidade apenas para a albumina, não produzindo resultados fidedignos para a avaliação do teor em globulinas (Marcos & Santos, 2011; Rakich & Lamiter, 2011; Wamsley & Alleman, 2004; Wood et al., 2012). Além disso, é valiosa apenas como um teste de triagem inicial, tendo em atenção que podem ocorrer falsos positivos e falsos negativos, particularmente quando a concentração proteica assume valores próximos ao limite máximo do intervalo de referência, ou seja, em leituras de 1+. Leituras iguais ou superiores a 2+ são confiáveis para a indicação de aumento da concentração de proteína no LCR (Behr et al., 2003; Jacobs, Cochrane, Lumsden, & Norris, 1990; Rakich & Lamiter, 2011; Wood et al., 2012).

---

<sup>1</sup> O termo intratecal é referente ao que está situado ou ao que ocorre no interior das meninges que envolvem o SNC ("Intratecal", n.d., para.1).

**Tabela 1** – Interpretação das leituras de tira urinária na análise da concentração de proteína do LCR (Wood et al., 2012).

<b>Leitura da tira urinária</b>	<b>Concentração de proteína (mg/dl)</b>
<b>0 ou -</b>	<30
<b>+</b>	30 – 100
<b>++</b>	100 – 300
<b>+++</b>	300 – 2000
<b>++++</b>	>2000

Para avaliar o teor em globulinas usa-se o teste de Pandy, cujo reagente (ácido carbólico a 10%) provoca a precipitação das globulinas, em caso de positividade do teste. A 1 ml de reagente são colocadas 2 a 4 gotas de LCR. No LCR normal não ocorre precipitação, pelo que será Pandy negativo, ou seja, a transparência mantém-se (Marcos & Santos, 2011; Rakich & Lamiter, 2011). O teste de Pandy tem uma sensibilidade de 50 mg/dl, pelo que aumentos da concentração de globulinas acima deste valor são evidenciados pela presença de turvação (Pandy positivo) e classificados entre 1+ e 4+ dependendo do grau de precipitação (Di Terlizzi & Platt, 2009; Johnson & Constantinescu, 2000; Marcos & Santos, 2011). Ainda que tenha boa sensibilidade, o teste de Pandy pode não detetar pequenos aumentos na concentração proteica com exatidão e precisão (Jacobs et al., 1990).

Nos laboratórios clínicos veterinários, estes testes qualitativos têm sido substituídos por métodos quantitativos, tratando-se, porém, de técnicas analíticas especializadas com reagentes específicos que não estão disponíveis na prática clínica (De Lorenzi & Mandara, 2016; Marcos & Santos, 2011; Wood et al., 2012). Da vasta panóplia de técnicas laboratoriais existentes, no que diz respeito à medição quantitativa da concentração de proteína no LCR, destacam-se as técnicas espectrofotométricas e as eletroforéticas (Johnson, 2008). Dentro da espectrofotometria, os métodos mais frequentemente utilizados são os colorimétricos e os turbidimétricos (Riond et al., 2014). Os colorimétricos baseiam-se na capacidade das proteínas se ligarem a corantes, sendo o Azul Brilhante de Coomassie e o Vermelho de Pyrogallol os mais comuns (Johnson, 2008; Riond et al., 2014). Quanto maior for a concentração de proteína na amostra, maior é a intensidade da cor resultante dessa ligação, medida no espectrofotómetro (Johnson, 2008; Pincus, Lifshitz, & Bock, 2017). Estes testes são rápidos, simples e pouco dispendiosos, todavia, com a desvantagem de os reagentes se poderem ligar a diferentes proteínas e a substâncias azotadas não proteicas (Johnson & Lott, 1978; Patrick & Thiers, 1963). Nos métodos turbidimétricos é necessário que ocorra a precipitação da proteína, sendo utilizados agentes precipitantes para o efeito (Johnson, 2008; Riond et al., 2014). A turvação causada pela proteína precipitada provoca a redução da intensidade da luz que incide na amostra de LCR, sendo tanto maior quanto a concentração de proteína. A turbidimetria, por meio de um espectrofotómetro, mede essa redução de

intensidade, permitindo, deste modo, quantificar a concentração de proteína do LCR (Kricka & Park, 2008; Pincus et al., 2017).

A eletroforese permite separar de forma simples e fidedigna as principais frações de proteínas, nomeadamente, albuminas,  $\alpha_1$ -globulinas,  $\alpha_2$ -globulinas,  $\beta$ -globulinas e  $\gamma$ -globulinas, tanto em amostras de soro como de LCR (Gama, Santana, Filho, & Nogueira, 2007; Harvey, 2012). No entanto, devido à baixa quantidade de proteínas no LCR, é necessária uma concentração prévia para aumentar a sensibilidade da sua deteção pela eletroforese (Gama et al., 2007; Johnson, 2008). Alterações nos padrões eletroforéticos da proteína do LCR são úteis na identificação de doenças inflamatórias, neoplásicas e degenerativas, visto que são conhecidos os padrões característicos destes mecanismos patológicos envolvidos (Chrisman, 1992; Di Terlizzi & Platt, 2009; Taylor, 2010). Ainda assim, num estudo sobre a utilidade da eletroforese de alta resolução no diagnóstico de doenças do SNC, verificou-se que os padrões eletroforéticos obtidos nos cães doentes não apresentaram especificidade para nenhuma doença em particular (Behr, Trumel, Cauzinille, Palenché, & Braun, 2006).

#### **5.2.1.1.1. Albumina e quociente de albumina**

A albumina é exclusivamente sintetizada no fígado, constituindo cerca de 80 – 95% da proteína existente no LCR (Di Terlizzi & Platt, 2009; Vernau et al., 2008). Uma vez que a albumina do LCR provém exclusivamente do plasma, a determinação da sua concentração, geralmente por eletroforese, permite avaliar a integridade da BHE/BSLCR (Chrisman, 1992; De Lorenzi & Mandara, 2016; Rakich & Lamiter, 2011). Esta avaliação é realizada por meio de um rácio entre a concentração de albumina no LCR e a concentração de albumina sérica, designado por quociente de albumina. A concentração de albumina no LCR é muito mais baixa que no sangue e, embora esta concentração possa variar de acordo com a concentração sérica, o rácio é mantido sob valores constantes nos animais saudáveis (Chrisman, 1992; Di Terlizzi & Platt, 2009). Deste modo, um aumento da concentração de albumina com consequente aumento do quociente de albumina é considerado um bom indicador de disfunção da BHE/BSLCR (Di Terlizzi & Platt, 2009; Vernau et al., 2008).

$$\text{Quociente de albumina} = \frac{\text{Albumina no LCR (mg/dl)}}{\text{Albumina no sangue (g/dl)}} \quad (\text{Vernau et al., 2008})$$

Um quociente de albumina superior a 2,35 sugere alterações na BHE/BSLCR com aumento da proteína no LCR associado ao extravasamento a partir do plasma (De Lorenzi & Mandara, 2016; Gama et al., 2007; Rakich & Lamiter, 2011). O comprometimento da BHE/BSLCR ocorre em grande parte das doenças do SNC, estando descrito em cães com encefalites virais (e. g., vírus da esgana), toxoplasmose, meningite bacteriana, abscessos tanto na medula espinhal como no encéfalo e doenças não inflamatórias, como estados convulsivos e urémia (Gama et al., 2007; Vernau et al., 2008).

### 5.2.1.1.2. *γ-globulinas e índice de IgG*

As  $\gamma$ -globulinas podem ser definidas, por meio de técnicas de eletroforese, como um grupo heterogêneo de proteínas com taxas de migração semelhantes. A fração gama destas globulinas contém as imunoglobulinas. No LCR encontram-se três imunoglobulinas principais: IgG, IgM e IgA, sendo a IgG a principal imunoglobulina presente num LCR inalterado (Di Terlizzi & Platt, 2009; Vernau et al., 2008).

À semelhança da albumina, a concentração de IgG no LCR está dependente da sua concentração sérica, pelo que o cálculo do rácio de IgG tem maior valor diagnóstico que o valor da IgG do LCR isolado (Di Terlizzi & Platt, 2009).

$$\text{Rácio IgG} = \frac{\text{IgG no LCR (mg/dl)}}{\text{IgG no sangue (g/dl)}} \quad (\text{Vernau et al., 2008})$$

No entanto, ao contrário da albumina, as IgG não provêm exclusivamente do plasma, podendo ser produzidas localmente, na presença de doenças inflamatórias do SNC. Deste modo, aumentos na concentração de IgG no LCR, e do seu rácio, podem ser indicativos tanto de alterações na BHE/BSLCR como de produção intratecal de IgG. Para diferenciar, é necessário ter em consideração o quociente de albumina, uma vez que este, como referido anteriormente, permite avaliar a integridade da BHE/BSLCR. Esta determinação é traduzida pelo chamado índice de IgG, formulado pela divisão do rácio de IgG pelo quociente de albumina (Chrisman, 1992; De Lorenzi & Mandara, 2016; Tipold, Pfister, & Vandeveld, 1993; Tipold, Pfister, Zurbriggen, & Vandeveld, 1994).

$$\text{Índice IgG} = \frac{\text{Rácio IgG}}{\text{Quociente de albumina}} \quad (\text{Vernau et al., 2008})$$

Um índice de IgG superior a 0,272 com um quociente de albumina normal é sugestivo de produção intratecal de IgG, enquanto aumentos concomitantes do índice de IgG e do quociente de albumina sugerem que o aumento de IgG no LCR provém de alterações da BHE/BSLCR (Chrisman, 1992; De Lorenzi & Mandara, 2016).

Tipold, Pfister et al. (1993) verificaram que as doenças inflamatórias podem estar associadas a um índice de IgG >1,3, podendo, contudo, estar normal, em alguns casos, nomeadamente na fase aguda da encefalite causada pelo vírus da esgana canina (Vandeveld, Zurbriggen, Steck, & Bichsel, 1986). Aumentos da concentração de IgG no LCR e do índice de IgG são característicos de doenças inflamatórias infecciosas, tendo sido igualmente encontrados em casos de doenças neoplásicas (neoplasias linfoides ou meningiomas com infiltração celular secundária) (Tipold, Pfister, et al., 1993; Vernau et al., 2008). Por outro lado, doenças degenerativas, compressão medular e mielopatia isquémica por embolismo fibrocartilágneo apresentaram valores normais ou ligeiramente elevados (Nghiem & Schatzberg, 2010; Tipold, Pfister, et al., 1993). Nas doenças infecciosas, aumentos de IgM e IgG refletem a presença de infeção aguda ou crónica, respetivamente (Nghiem & Schatzberg, 2010).

### **5.2.1.1.3. IgM e IgA**

A IgM e a IgA do LCR também provêm do plasma, normalmente, podendo, todavia, serem sintetizadas no SNC em certas doenças, particularmente, de natureza inflamatória (Vernau et al., 2008).

A presença de IgM não é um achado normal no LCR, o que lhe atribui um possível valor diagnóstico (Di Terlizzi & Platt, 2009). As IgM são detetadas nos primeiros estadios da resposta imunitária humoral do organismo e são as primeiras imunoglobulinas a retornarem aos valores normais de concentração quando o antígeno desaparece. Por esta razão, a presença de IgM no soro e/ou LCR é considerada mais específica que os níveis de IgG ou imunoglobulinas totais para a detecção de doenças infecciosas ativas (Chrisman, 1992; Vernau et al., 2008). IgM ou IgG, ou ambas, elevadas têm sido descritas em casos de meningite-arterite responsiva a corticosteroides (MARC) (Tipold, 1995).

A IgA está normalmente presente em baixas concentrações no soro mas tem o papel principal na primeira linha de defesa contra infecções que surgem através das mucosas. Elevadas concentrações de IgA têm sido encontradas em cães com MARC, sendo a sua medição recomendada em casos de suspeita desta doença (Cizinauskas, Jaggy, & Tipold, 2000; Di Terlizzi & Platt, 2009; Tipold, 1995). Num estudo, obteve-se uma sensibilidade de 91% e uma especificidade de 78% na medição de IgA para o diagnóstico de MARC (Maiolini, Carlson, Schwartz, Gandini, & Tipold, 2012). Os níveis de IgA no LCR podem estar também aumentados em casos de meningoencefalite granulomatosa (MEG) e encefalite por vírus da esgana canina, ainda que os níveis séricos, nestas doenças, estejam normais ou ligeiramente elevados (Di Terlizzi & Platt, 2009; Tipold & Jaggy, 1994; Tipold et al., 1994).

Diversas outras proteínas podem estar aumentadas na presença de doença do SNC, embora grande parte não se correlacione com uma doença específica, o que limita a sua utilidade clínica (Vernau et al., 2008). A título de exemplo, a proteína básica da mielina tem sido utilizada como indicador de desmielinização, tendo apresentado, segundo Oji, Kamishina, Cheeseman e Clemmons (2007), aumentos na sua concentração média no LCR de cães com mielopatia degenerativa.

### **5.2.1.2. Determinação de títulos de anticorpos específicos**

A detecção de anticorpos específicos no LCR e a sua comparação com os níveis séricos pode ser útil no diagnóstico de diversas afeções virais, fúngicas, protozoárias, parasitárias, entre outras, sendo muitas vezes utilizada em casos de borreliose, toxoplasmose e infecção pelo vírus da esgana (De Lorenzi & Mandara, 2016; Greene & Vandevelde, 2012; Kent, 2012; Lunn, Lee, Martin, & Malik, 2003; Vernau et al., 2008).

À semelhança do índice de IgG, estão descritas técnicas para a medição da produção intratecal de anticorpos, que utilizam, no entanto, títulos de anticorpos antígeno-específicos em vez da IgG total (Di Terlizzi & Platt, 2009; Furr, 2002).

A prevalência de autoanticorpos no LCR obtidos de cães com diversas doenças do SNC tem sido documentada. Foram detetados autoanticorpos anti-astrocíticos em LCR canino que, apesar de considerados altamente específicos para meningoencefalite necrosante e MEG, têm sido também detetados em casos de neoplasias cerebrais, possivelmente como resposta a alterações na BHE/BSLCR (De Lorenzi & Mandara, 2016; Matsuki et al., 2004; Tipold, Vandeveld, & Schatzberg, 2012).

#### **5.2.1.3. Dissociação albuminocitológica**

A dissociação albuminocitológica é relativamente comum e consiste no aumento da proteína com um número normal de células (Dewey et al., 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Levine & Levine, 2012; Marcos & Santos, 2011; Wood et al., 2012). Ocorre em doenças que alterem a BHE/BSLCR, que aumentem a produção local de proteína ou que obstruam o fluxo de LCR e, consequentemente, o da proteína (Wamsley & Alleman, 2004; Wood et al., 2012). As causas mais comuns não são inflamatórias, podendo incluir traumatismo, doença discal intervertebral (DDIV) e êmbolos fibrocartilagíneos (Levine & Levine, 2012; Marcos & Santos, 2011; Wood et al., 2012). Outras causas menos frequentes incluem as neoplasias primárias do SNC, doenças imunomediadas, a mielopatia degenerativa, mielopatia isquêmica, atividade pós-convulsão, febre, mielomalacia ou MEG (De Lorenzi & Mandara, 2016; Marcos & Santos, 2011; Vernau et al., 2008; Wamsley & Alleman, 2004).

O aumento da concentração de proteína pode estar associado a uma população celular alterada, embora a CTCN esteja normal. Isto verifica-se não só em doenças que não envolvam as meninges ou as células endoteliais, como uma fratura vertebral ou uma grave atividade convulsiva, mas também em doenças inflamatórias em que a CTCN tenha sido reduzida pela administração de glucocorticoides ou antibióticos antes da colheita (Wamsley & Alleman, 2004).

#### **5.2.1.4. Glucose**

A glucose é transportada para o LCR por difusão facilitada, exclusivamente a partir do sangue. A concentração de glucose no LCR está dependente da sua concentração sérica, da sua taxa de transporte para o LCR e da taxa metabólica do SNC (Cook & DeNicola, 1988; Vernau et al., 2008). Ainda que alguns laboratórios possam medir a concentração de glucose por rotina, esta pode facilmente ser medida também, na prática clínica, por um glucómetro (Wood et al., 2012). A glucose no LCR normal apresenta entre 60% e 80%, aproximadamente, da concentração sérica (Vernau et al., 2008; Wood et al., 2012). A medição da concentração sérica de glucose deve ser feita cerca de uma hora antes da colheita do LCR, uma vez que, quando surgem alterações, estas não são imediatamente refletidas na concentração da glucose no LCR (Cook & DeNicola, 1988; Vernau et al., 2008). Aumentos da concentração de glucose no LCR geralmente refletem situações de hiperglicémia (Vernau et al., 2008). No entanto, a diminuição da concentração de glucose no LCR é mais frequentemente observada,

principalmente em casos de meningite bacteriana (De Lorenzi & Mandara, 2016; Wood et al., 2012).

#### **5.2.1.5. Eletrólitos e enzimas**

A medição de diversos eletrólitos e enzimas no LCR tem sido descrita em animais, contudo, apresentam, geralmente, um valor diagnóstico limitado (Cook & DeNicola, 1988; De Lorenzi & Mandara, 2016; Vernau et al., 2008). A concentração de eletrólitos no LCR deve ser medida em simultâneo com a do sangue, sendo útil na detecção de desequilíbrios eletrolíticos (Rakich & Lamiter, 2011). Em comparação com um ultrafiltrado do plasma, o LCR tem uma composição contendo maiores concentrações de cloreto, sódio e magnésio, e menores concentrações de aminoácidos, ácido úrico, potássio, bicarbonato, cálcio e fosfato (Skipor & Thiery, 2008). As enzimas no LCR podem ser oriundas do sangue, do tecido nervoso, de neoplasias do SNC e de células presentes no líquido (Vernau et al., 2008). Aumentos da atividade da creatina quinase, lactato desidrogenase, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase têm sido descritos em várias doenças do SNC, sem, no entanto, estarem especificamente associados a uma doença em particular (Cook & DeNicola, 1988; Rakich & Lamiter, 2011).

As metaloproteínases de matriz (MMPs – *Matrix metalloproteinases*) formam um grupo de endopeptidases que degradam componentes da matriz extracelular (Birkedal-Hansen et al., 1993; De Lorenzi & Mandara, 2016). Diversos estudos demonstraram haver atividade elevada da MMP-9 em diferentes afeções do SNC, nomeadamente, DDIV e neoplasias intracranianas, tendo sido também associada ao prognóstico (Levine et al., 2006; Mariani et al., 2013; Nagano et al., 2011; Wood et al., 2012).

#### **5.2.2. Contagens celulares**

A contagem de células totais é dividida pela determinação da concentração de eritrócitos e de células nucleadas presentes no LCR (Taylor, 2010; Wood et al., 2012). Dado que a concentração celular no LCR normal, e por vezes no alterado, é demasiado baixa para ser detetada pela análise hematológica padrão, as contagens de células do LCR têm de ser feitas manualmente no hemocitómetro, procedendo-se ao enchimento direto da câmara de ambos os lados, sem realizar qualquer diluição do líquido (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Fry et al., 2006; Marcos & Santos, 2011; Rakich & Lamiter, 2011; Wood et al., 2012). É utilizada, geralmente, uma câmara de Neubauer ou Fuchs-Rosenthal, que é colocada sob um ambiente humidificado durante até 10 – 15 minutos para permitir que as células adiram à superfície do vidro (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010). Os eritrócitos e as células nucleadas são contados separadamente (Di Terlizzi & Platt, 2009; Rakich & Lamiter, 2011). Certos estudos referem que a adição do corante novo azul-de-metileno pode facilitar a distinção entre os eritrócitos e os leucócitos sem afetar as contagens celulares (Fry et al., 2006; Wood et al., 2012). Os leucócitos têm uma

aparência granular, pontilhada e são, geralmente, maiores que os eritrócitos. Estes, por sua vez, são translúcidos, bicôncavos e sem estruturas internas, podendo apresentar bordas espiculadas. Os linfócitos pequenos podem ser facilmente confundidos com os eritrócitos por clínicos inexperientes (Wood et al., 2012). Os intervalos de referência descritos para as contagens celulares indicam valores  $\leq 5$  células nucleadas/ $\mu\text{l}$  e de zero eritrócitos/ $\mu\text{l}$  no LCR canino normal (Chrisman, 1992; Cook & DeNicola, 1988; De Lorenzi & Mandara, 2016; Dewey et al., 2016; Marcos & Santos, 2011; Taylor, 2010; Wood et al., 2012).

### **5.3. Avaliação citológica**

Quando a amostra a avaliar tem um volume limitado, a sequência de análise recomendada começa, normalmente, com as contagens celulares, seguida da concentração da proteína total e, por fim, da citologia. Em casos de suspeita de MEG e linfoma, a citologia assume preferência. A padronização do volume utilizado para a avaliação citológica pode ser benéfica para minimizar as variações analíticas e auxiliar na interpretação dos resultados. A avaliação de múltiplas preparações ou preparações de grandes volumes de LCR aumenta a probabilidade de serem detetadas pequenas alterações (De Lorenzi & Mandara, 2016).

Podem não haver alterações citológicas no LCR em casos de epilepsia idiopática, hidrocefalia congênita, intoxicação, doenças metabólicas ou funcionais, doença vertebral ou mielomalacia, pelo que a ausência de alterações não descarta a possibilidade de doença do SNC (De Lorenzi & Mandara, 2016).

#### **5.3.1. Métodos de preparação citológica**

Uma vez que o LCR normal possui muito baixa celularidade, caso a contagem de leucócitos fique abaixo de 500 células/ $\mu\text{l}$  são necessárias técnicas de concentração para a obtenção de um número suficiente de células para a avaliação citológica, podendo ser utilizadas as técnicas de citocentrifugação, sedimentação ou de filtração por membrana (De Lorenzi & Mandara, 2016; Marcos & Santos, 2011; Taylor, 2010). A técnica de filtração por membrana aplicada ao LCR baseia-se na retenção dos componentes celulares, devido aos pequenos poros da membrana, permitindo uma preservação imediata das estruturas celulares, importante na avaliação microscópica desses componentes (Cellio, 2001). Porém, esta técnica requer uma coloração especial que não está normalmente disponível nas clínicas (Cook & DeNicola, 1988; De Lorenzi & Mandara, 2016).

Atualmente, a citocentrifugação é considerada o melhor método para a concentração celular, em medicina veterinária e pode ser realizada na maioria das instituições e laboratórios de referência (Cook & DeNicola, 1988; Marcos, Santos, Marrinhas, Correia-Gomes, & Caniatti, 2016; Taylor, 2010). Trata-se de uma técnica fácil de realizar, que necessita de baixas quantidades de LCR (100 – 150  $\mu\text{l}$ ), concentra as células rapidamente e permite uma boa dispersão na amostra centrifugada (Cellio, 2001; Freeman, 2007; Marcos & Santos, 2011).

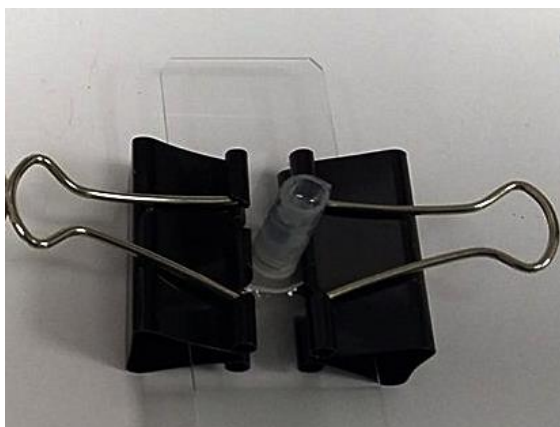


Deste modo, preserva a morfologia celular, embora possa ocorrer uma ligeira distorção celular (Almeida et al., 2016; Freeman, 2007). Além disso, tem a desvantagem de a utilização de citocentrífugas automáticas encarecerem o procedimento (Cellio, 2001; Ducos, Donoso, Weickhardt, & Vietti, 1979). Na sua execução, o LCR é submetido a um ciclo de 500 a 1000 rotações por minuto (rpm), durante 5 minutos (Cellio, 2001). As células são centrifugadas diretamente para uma pequena área de uma lâmina, sendo recomendada a obtenção de duas lâminas por amostra (Cellio, 2001; Freeman, 2007; Marcos et al., 2016). O sobrenadante é, então, removido com agulha e seringa e a amostra é seca com um ciclo curto de centrifugação (Bauer, 2014). Marcos et al. (2016) desenvolveram uma citocentrífuga manual com o intuito de obter preparações por citocentrifugação de uma forma mais económica e acessível a clínicas mais pequenas. Ao comparar com a citocentrífuga automática, concluíram que a recuperação celular era semelhante em ambos os métodos, sendo este novo método útil no diagnóstico por citologia em locais e condições onde os recursos são mais escassos.

A sedimentação é um método simples, moderadamente rápido, que proporciona uma recuperação celular de aproximadamente 60% (Cellio, 2001). Em comparação com a citocentrifugação, a sedimentação apresenta menor recuperação celular, porém com melhor preservação citomorfológica (Almeida et al., 2016; Ducos et al., 1979). Diversas técnicas de sedimentação têm sido descritas para o seu uso na prática ou em laboratórios de referência, para os quais seja possível uma rápida submissão das amostras de LCR (Cook & DeNicola, 1988; De Lorenzi & Mandara, 2016). Podem utilizar-se, contudo, sistemas simples, construídos com seringas de insulina e molas, sendo úteis quando as amostras não podem ser entregues atempadamente a um laboratório competente. Estes sistemas apresentam a desvantagem de necessitarem de um mínimo de 200 µl de LCR e de cerca de 1 hora para que a sedimentação celular ocorra, com consequentes alterações morfológicas (De Lorenzi & Mandara, 2016; Marcos & Santos, 2011).

O sistema constrói-se com um papel de filtro, em que é feito um furo (com um furador), duas molas, uma lâmina de microscopia e uma seringa de insulina com o êmbolo removido e cortada ao meio. O papel de filtro é colocado sobre a lâmina e a base da seringa sobre o furo, fixando com as molas (Figura 9). O LCR é depositado e fica a repousar durante 1 hora (Bauer, 2014; Marcos & Santos, 2011; Taylor, 2010). O sobrenadante é então cuidadosamente aspirado com seringa e agulha, podendo ser usado na determinação da concentração de proteínas ou na titulação de anticorpos. Qualquer líquido remanescente é removido pelo papel absorvente e a lâmina é rapidamente seca por agitação vigorosa no ar. Na impossibilidade da lâmina chegar a um laboratório em poucas horas, deve ser corada com colorações de Romanowsky (Giemsa, Wright's ou Diff-Quick), isoladamente ou combinadas, que estão normalmente disponíveis nos laboratórios de referência e nos laboratórios da prática clínica (Bauer, 2014; De Lorenzi & Mandara, 2016; Wood et al., 2012). Geralmente não é necessária uma fixação adicional (Bauer, 2014).

**Figura 9** – Sistema utilizado para a sedimentação de amostras de LCR com demonstração da fixação da base da seringa sobre a lâmina pelas molas (fotografia original).



### 5.3.2. Contagens diferenciais de células nucleadas

A avaliação citológica do LCR é essencial, uma vez que alterações no tipo ou na morfologia celulares, assim como microrganismos, podem estar presentes mesmo quando a CTCN está dentro dos limites da normalidade (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Rakich & Lamiter, 2011; Taylor, 2010; Wood et al., 2012).

Os diferentes estudos são contraditórios quanto às células predominantes numa amostra normal de LCR, apesar de todos afirmarem que são mononucleares (Marcos & Santos, 2011). Estas células mononucleares consistem em pequenos linfócitos, semelhantes aos do sangue, e grandes células classificadas como monocitoides (Chrisman, 1992; De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009). Quando as células monocitoides apresentam material fagocitado, são denominadas de macrófagos que são encontrados ocasionalmente em LCR normais. Por vezes, também podem ser observados neutrófilos, que, no entanto, para serem enquadrados na normalidade, devem ser muito escassos e não apresentar sinais de degenerescência. Em casos de contaminação, de quebra da BHE/BSLCR ou hemorragia do SNC, podem ser encontrados eritrócitos (Marcos & Santos, 2011).

### 5.3.3. Pleocitose

A elevação do número de células nucleadas no LCR denomina-se pleocitose e está associada, sobretudo, a doenças inflamatórias, mas também, eventualmente, a doenças neoplásicas, do SNC (Tabela 2) (Dewey et al., 2016; Levine & Levine, 2012; Marcos & Santos, 2011).

**Tabela 2** – Diagnósticos diferenciais com base apenas na CTCN (Wood et al., 2012).

<b>5 – 25 células/<math>\mu</math>l</b>	Vascular, traumatismo, neoplasia, DDIV,iringomielia, atividade convulsiva recente
<b>25 – 50 células/<math>\mu</math>l</b>	Traumatismo, neoplasia, +/- vascular, DDIV, inflamatório
<b>&gt;50 células/<math>\mu</math>l</b>	Inflamatório (infecioso ou não), DDIV (menos comum), traumatismo

Quanto maior for o envolvimento meníngeo, maior será o grau da pleocitose, independentemente da causa inicial subjacente (Dewey et al., 2016; Marcos & Santos, 2011). Se a lesão se cingir ao parênquima nervoso, ou apresentar resposta inflamatória mínima, a pleocitose poderá não ocorrer. A ausência de pleocitose pode ainda estar relacionada com um tratamento prévio com glucocorticoides ou antibióticos. A pleocitose deverá ser sempre quantificada em ligeira, moderada ou grave, permitindo estabelecer a sua relação com a afeção mais frequente. Embora haja muitas variações na literatura sobre como classificar o grau de pleocitose, apresentamos como valores indicativos para a pleocitose ligeira, contagens <50 células/μl, para a moderada, 50 – 500 células/μl e para a grave, >500 células/μl (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Levine & Levine, 2012; Marcos & Santos, 2011). Através da contagem diferencial de células, podemos classificar a pleocitose, de acordo com a população leucocitária predominante, em neutrofílica (>75% de neutrófilos), mononuclear (>75% de células mononucleares), eosinofílica (>10 – 20% de eosinófilos) ou mista (população heterogénea incluindo neutrófilos, linfócitos, células monocitoides, macrófagos, eosinófilos ou plasmócitos), estando igualmente descritos variados valores de percentagem das células predominantes, na literatura (Levine & Levine, 2012; Marcos & Santos, 2011; Wood et al., 2012). A gravidade da pleocitose, o tipo de células predominante e os resultados de outros testes, como os imagiológicos, devem ser analisados em conjunto para chegar a um diagnóstico (Levine & Levine, 2012).

#### **5.3.3.1. Pleocitose neutrofílica**

A pleocitose neutrofílica tem sido descrita num amplo conjunto de doenças inflamatórias agudas, infeções bacterianas e infeções fúngicas (Chrisman, 1992; Cook & DeNicola, 1988; Di Terlizzi & Platt, 2009). As doenças inflamatórias agudas incluem traumatismo, MARC, meningite asséptica pós-mielográfica, mielomalacia, hemorragias e neoplasias (Cook & DeNicola, 1988; De Lorenzi & Mandara, 2016; Dewey et al., 2016; Levine & Levine, 2012; Meric, 1988; Wood et al., 2012). Uma pleocitose neutrofílica, ligeira a moderada, pode estar relacionada com a necrose provocada pelo vírus da esgana (Marcos & Santos, 2011). Os neutrófilos associados a doenças infecciosas (e.g., meningite bacteriana) têm maior probabilidade de estarem degenerados do que aqueles presentes nas doenças não infecciosas (e.g., MARC) (Dewey et al., 2016).

Numerosos sinónimos são utilizados para descrever a MARC, como por exemplo, vasculite necrosante, poliarterite e síndrome de dor do Beagle, estando estabelecido, no entanto, segundo a literatura veterinária, que a melhor descrição define a MARC como uma doença imunológica sistémica caracterizada por lesões inflamatórias das leptomeninges e artérias associadas que respondem tipicamente aos corticosteroides (De Lahunta & Glass, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010; Marcos & Santos, 2011). Na MARC os neutrófilos presentes não mostram sinais degenerativos, ainda que sejam frequentes alterações relacionadas com a

idade das células, como a hiperpigmentação ou a picnose do núcleo, e as culturas de LCR surgem negativas para bactérias (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Marcos & Santos, 2011). A MARC pode estar associada a uma pleocitose neutrofílica acima das 500 células/ $\mu$ L, com uma percentagem de 75 – 100%. Ocorre, muitas vezes, uma recuperação nas primeiras 72 horas após a administração de glucocorticoides (Chrisman, 1992; De Lorenzi & Mandara, 2016).

A meningite/meningoencefalite bacteriana é rara em medicina veterinária e apresenta neutrófilos degenerados, com contagens celulares aumentadas ou até normais (De Lorenzi & Mandara, 2016; Marcos & Santos, 2011). Os casos não tratados muitas vezes produzem uma pleocitose marcada com valores acima das 1000 células/ $\mu$ L. A identificação de bactérias na citologia e cultura do LCR é essencial para o diagnóstico da doença mas é muito pouco comum (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009). Quanto a infeções fúngicas, a pleocitose neutrofílica tem sido descrita em casos de blastomicose e criptococose (Chrisman, 1992; Meric, 1988). Todavia, numa meningite bacteriana ou fúngica que tenha sido tratada com antibióticos durante pelo menos uma semana, as células mononucleares podem substituir os neutrófilos como células predominantes (Di Terlizzi & Platt, 2009).

As neoplasias do SNC podem induzir necrose tumoral, levando a uma inflamação neutrofílica no LCR, estando associada, principalmente, a casos de meningiomas intracranianos em cães (Di Terlizzi & Platt, 2009).

Pode ocorrer um aumento da percentagem de neutrófilos sem aumentos na CTCN, sendo indicativo de uma inflamação ligeira ou precoce, de uma lesão que não contacta com as meninges nem com as células endoteliais ou de administração prévia de glucocorticoides e antibióticos, que reduzem a resposta inflamatória (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009). Tem sido descrito um aumento da percentagem de neutrófilos com CTCN normal em casos de DDIV, fraturas vertebrais, acidentes vasculares encefálicos (enfarte/hemorragia) e tromboembolismo fibrocartilágneo em cães (Di Terlizzi & Platt, 2009; Thomson, Kornegay, & Stevens, 1989).

#### **5.3.3.2. Pleocitose mononuclear**

A pleocitose mononuclear refere-se a uma predominância ou de pequenos linfócitos, ou de grandes células monocitoides no LCR e ocorre em casos de infeções fúngicas, virais, por riquetsias, protozoárias e bacterianas crónicas (Dewey et al., 2016; English & Volk, 2014).

##### **5.3.3.2.1. Linfócitos**

A forma mais comum de pleocitose mononuclear é a linfocítica (com >50% de linfócitos) e consiste maioritariamente por pequenos linfócitos maduros, com pequenas quantidades de linfócitos reativos e de grandes células monocitoides (Wood et al., 2012). Os linfócitos têm um diâmetro de 9 – 15  $\mu$ m com um núcleo escuro, compacto, de redondo a oval, com um escasso citoplasma basófilo pálido. A presença de linfócitos médios e grandes é sugestiva de lesão,

mesmo se a CTCN não estiver aumentada (Chrisman, 1992; Cook & DeNicola, 1988; Di Terlizzi & Platt, 2009). Estes apresentam grandes núcleos com um padrão de cromatina mais disperso e um citoplasma muito mais abundante com alguns grânulos azurofílicos densos (Di Terlizzi & Platt, 2009).

Uma pleocitose linfocítica é característica das infecções virais, porém pode estar também associada a MARC, MEG, encefalite necrosante, polirradiculoneurite, toxoplasmose, neosporose, erliquiose ou, menos frequentemente, linfomas (De Lorenzi & Mandara, 2016; Dewey et al., 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; English & Volk, 2014; Marcos & Santos, 2011). No entanto, células monocitoides/macrófagos podem ser predominantes nestas doenças, mas são-no maioritariamente em casos de criptococose (De Lorenzi & Mandara, 2016).

A infecção pelo vírus da esgana (*Morbillivirus*) é uma das principais causas de sintomatologia neurológica no cão, nomeadamente na fase crónica da infecção (English & Volk, 2014; Marcos & Santos, 2011). O LCR caracteriza-se por uma ligeira a moderada pleocitose linfocítica, com contagens celulares normais ou acima das 50 células/ $\mu$ l, tendo mais de 60% de linfócitos (Abate et al., 1998; De Lorenzi & Mandara, 2016). Podem surgir também um aumento no número de macrófagos e, ocasionalmente, corpos de inclusão eosinofílicos, específicos do vírus, no citoplasma (Abate et al., 1998; Marcos & Santos, 2011). Infecções pelo vírus da raiva estão também associadas a pleocitoses linfocíticas (De Lorenzi & Mandara, 2016).

Está descrita a ocorrência de encefalite necrosante em cães de raças pequenas (leucoencefalite necrosante e meningoencefalite necrosante), que demonstra uma necrose, de multifocal a massiva, e uma inflamação não supurativa do cérebro e das meninges que não responde aos glucocorticoides, podendo ser fatal (De Lorenzi & Mandara, 2016; Timmann, Konar, Howard, & Vandeveld, 2007; Tipold, Fatzer, Jaggy, Zurbriggen, & Vandeveld, 1993). O LCR apresenta-se com uma pleocitose, ligeira a moderada, geralmente acima das 200 células/ $\mu$ l, com predominância de linfócitos e com uma concentração proteica acima dos 50 mg/dl (De Lorenzi & Mandara, 2016; Dewey et al., 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Nos casos de linfocitose é importante avaliar a morfologia das células, uma vez que os linfócitos podem apresentar sinais de reatividade, surgindo como plasmócitos, o que evidencia a produção de imunoglobulinas a nível do SNC (neste caso o teste de Pandy deverá ser positivo) (Marcos & Santos, 2011). Os plasmócitos são característicos de uma resposta inflamatória inespecífica e são observados em casos de meningoencefalite necrosante e diversas doenças infecciosas mas, sobretudo, em casos de MEG (Wood et al., 2012). A presença de linfócitos reativos com CTCN normal pode também ser sinal de doença do SNC (Di Terlizzi & Platt, 2009).

### **5.3.3.2. Monócitos**

Os monócitos têm um diâmetro de 12 – 15 µm com um núcleo oval, por vezes em forma de rim, ou ligeiramente lobulado, que cora menos intensamente que o núcleo dos linfócitos pequenos, e um citoplasma basófilo pálido abundante, finamente vacuolizado (Chrisman, 1992; Cook & DeNicola, 1988). Os monócitos transformam-se em macrófagos em situações patológicas, nomeadamente, reações inespecíficas a inflamação, hemorragia ou degenerescência. Os macrófagos podem ser vacuolizados e podem conter uma variedade de material fagocitado, entre gotículas de gordura, eritrócitos, agentes infecciosos e detritos celulares em vários estados da digestão (Di Terlizzi & Platt, 2009; Wood et al., 2012). Células monocitoides ativadas e macrófagos podem aparecer em aglomerados que mimetizam as células epiteliais (Di Terlizzi & Platt, 2009).

### **5.3.3.3. Pleocitose eosinofílica**

Em raras ocasiões, podem ser encontrados eosinófilos no LCR normal de cães, estando sobretudo associados a contaminação sanguínea (Chrisman, 1992; De Lorenzi & Mandara, 2016; Smith-Maxie, Parent, Rand, Wilcock, & Norris, 1989). A pleocitose eosinofílica no LCR é também rara e nem sempre está associada a uma eosinofilia do sangue periférico (Dewey et al., 2016; Smith-Maxie et al., 1989). Respostas inflamatórias agudas inespecíficas podem aumentar o número de eosinófilos no LCR. Esta afeção tem sido descrita como meningoencefalite eosinofílica responsiva a córticos e tem sido identificada em cães (Chrisman, 1992; De Lorenzi & Mandara, 2016). No LCR, nestes casos, verificam-se percentagens de eosinófilos acima dos 80% com pleocitose, ligeira a marcada, podendo ocorrer descidas acentuadas no número de células e alterações nas percentagens diferenciais, na resposta aos glucocorticoides (De Lorenzi & Mandara, 2016).

A pleocitose eosinofílica também pode resultar de migrações internas por parasitas, infeções por *Prototheca*, reações de hipersensibilidade, processos neoplásicos, infeções protozoárias, como a toxoplasmose e a neosporose, doenças fúngicas como a criptococose e, embora raramente, em infeções pelo vírus da esgana canina e da raiva (Chrisman, 1992; De Lorenzi & Mandara, 2016; Dewey et al., 2016). Quando a pleocitose eosinofílica não apresenta uma etiopatogenia subjacente definida é chamada de meningoencefalomielite eosinofílica idiopática (Dewey et al., 2016; Windsor, Sturges, Vernau, & Vernau, 2009). Negrin, Cherubini e Steeves (2008) encontraram pela primeira vez uma larva de *Angiostrongylus vasorum* no LCR de um Pug que apresentava uma pleocitose mista, pelo que, doenças parasitárias do SNC não podem ser descartadas na ausência de pleocitose eosinofílica.

Um aumento na percentagem de eosinófilos sem aumentos da CTCN tem sido descrito concomitantemente com migração parasitária ou doença protozoária (*Neospora spp.* em cães) (Chrisman, 1992; De Lorenzi & Mandara, 2016).

#### **5.3.3.4. Pleocitose mista**

A pleocitose mista é caracterizada por uma população de células heterogênea, incluindo linfócitos, células monocitoides/macrófagos, neutrófilos e poucos, ou mesmo raros, eosinófilos e plasmócitos, sendo que nenhum tipo celular representa mais do que 70% da população. Este tipo de pleocitose é mais comum em casos de MEG, sendo, igualmente, encontrada em grande parte das MARC, na sua fase crônica (Chrisman, 1992; Marcos & Santos, 2011). Na MEG, o LCR apresenta características muito variáveis, sendo a mais frequente a pleocitose mista, ligeira a moderada, com CTCN maioritariamente acima das 100 células/ $\mu$ l, com predominância de linfócitos (De Lorenzi & Mandara, 2016; Marcos & Santos, 2011; Rakich & Lamiter, 2011). As restantes células presentes são neutrófilos não degenerados e células monocitoides/macrófagos (Marcos & Santos, 2011).

O quadro misto está também associado a infeções por fungos/protozoários (criptococose, histoplasmose, blastomicose e aspergilose; toxoplasmose e neosporose), erliquiose, prototecose, infeções bacterianas crônicas e neoplasias (à exceção dos meningiomas) (Chrisman, 1992; Elias & Brown, 2008; Marcos & Santos, 2011). Uma pleocitose mista, ligeira a moderada, pode resultar de uma necrose ou inflamação secundária a doenças discais, mielomalacia hemorrágica, isquémia ou enfarte (Chrisman, 1992).

Em situações de trauma medular ou cerebral e compressão medular por mielopatia degenerativa o LCR geralmente apresenta características normais. Porém, pode apresentar uma pleocitose mista ligeira não purulenta (Marcos & Santos, 2011). No caso de compressão medular, o LCR só mostrará alterações se, pela gravidade ou cronicidade, as meninges forem afetadas (Elias & Brown, 2008; Marcos & Santos, 2011).

#### **5.3.4. Outros achados**

Outras células podem ser encontradas no LCR normal como as do revestimento meníngeo, do plexo coroide e ependimárias (Cook & DeNicola, 1988; Wood et al., 2012). O aparecimento ocasional destas células no LCR de cães deve ser interpretado, muito provavelmente, como resultado de contaminação pela punção (Wessmann, Volk, Chandler, Brodbelt, & Szladovits, 2010).

Além destas células, foram associados à contaminação iatrogénica outros achados como substâncias extracelulares semelhantes a mielina (mielina degenerada, fragmentos de mielina), neurónios e neurópilo<sup>2</sup>, ao nível da cisterna magna, e células hematopoiéticas, ao nível da região lombar (Christopher, 1992; De Lorenzi & Mandara, 2016; Fallin, Raskin, & Harvey, 1996; Wood et al., 2012). A mielina pode ser encontrada tanto fagocitada em macrófagos como livre, em casos de mielomalacia ou alterações desmielinizantes como a mielopatia degenerativa (Wood et al., 2012).

---

<sup>2</sup> Termo utilizado para definir a densa rede de prolongamentos gliais, axónios, dendrites e fibrilhas nervosas, localizada na substância cinzenta do SNC (De Lorenzi & Mandara, 2016).

Podem ser encontradas, ainda que raramente, células epiteliais escamosas maduras no LCR, provenientes, provavelmente, da contaminação a partir da pele ou, possivelmente, do revestimento de quistos epidermóides<sup>3</sup> (De Lorenzi & Mandara, 2016; Wood et al., 2012).

Em casos de neoplasia, a concentração de proteína está muitas vezes aumentada e algumas células atípicas ou neoplásicas são ocasionalmente observadas no LCR, dependendo do local da massa, da sua proximidade do ventrículo, do envolvimento das meninges ou da comunicação com o espaço subaracnoide. Os diagnósticos diferenciais para a presença de células redondas atípicas no LCR em cães incluem linfoma/linfossarcomas, meduloblastomas, papilomas e carcinomas do plexo coroide, histiocitose maligna e carcinomatose leptomeníngea (Behling-Kelly, Petersen, Muthuswamy, Webb, & Young, 2010; De Lorenzi & Mandara, 2016; Snyder, Shofer, Winkle, & Massicotte, 2006; Thompson, Russell, Levine, & Weeks, 2003; Wood et al., 2012).

Os plasmocitomas são neoplasias de células redondas, menos comuns, que podem alterar o LCR e que aparentam ter origem histiocítica, o que os torna difíceis de distinguir de uma MEG (Sheppard, Chrisman, Newell, Raskin, & Homer, 1997; Stowe, Escobar, & Neel, 2012; Zimmerman et al., 2006).

## **5.4. Outros testes laboratoriais**

### **5.4.1. Cultura de LCR**

As culturas de LCR são reservadas geralmente para os casos em que há uma forte suspeita de doença infecciosa, incluindo a presença de sinais sistêmicos e alterações hematológicas ou bioquímicas (Nghiem & Schatzberg, 2010). As culturas bacterianas, aeróbicas e anaeróbicas, são também recomendadas quando as amostras de LCR contêm neutrófilos degenerados ou quando são identificadas bactérias na citologia. Todavia, trata-se de um teste pouco sensível, havendo falsos-negativos em mais de 70% dos casos (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Radaelli & Platt, 2002; Wood et al., 2012). Diversos fatores podem contribuir para os fracos resultados da cultura de LCR em medicina veterinária, por exemplo, o pequeno volume de LCR disponível, o confinamento da maioria dos microrganismos no parênquima cerebral, um número baixo de microrganismos no LCR, microrganismos de crescimento lento ou que requerem técnicas de cultura não padronizadas, uma manipulação inapropriada da amostra ou do meio de cultura e, ainda, animais que recebam antibioterapia antes da colheita de LCR (De Lorenzi & Mandara, 2016; Di Terlizzi & Platt, 2009; Kent, 2012). O LCR pode também suprimir o crescimento bacteriano tanto pela presença de inibidores específicos como pela ausência de nutrientes que suportem o crescimento (Agbayani, Braun, Chang, Glass, & Evans, 1981). *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, e *Pasteurella* são

---

<sup>3</sup> Os quistos epidermóides são lesões congénitas, raras, que surgem principalmente em cães jovens em estruturas ao longo do neuroeixo como o quarto ventrículo, o cerebelo e o tronco cerebral (De Lorenzi & Mandara, 2016; Lipitz, Rylander, & Pinkerton, 2011).



bactérias aeróbias que podem causar infecção no SNC; *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, e *Eubacterium* são espécies anaeróbias que têm sido descritas (De Lorenzi & Mandara, 2016).

Culturas fúngicas e isolamento viral têm também sido bem-sucedidos em amostras de LCR em casos de criptococose e de meningoencefalites por vírus da esgana, respetivamente (Di Terlizzi & Platt, 2009; Kai et al., 1993; Sykes & Malik, 2012). Contudo, têm sido substituídas por testes de títulos de anticorpos e antígenos e de PCR (Wood et al., 2012).

#### **5.4.2. PCR**

A tecnologia baseada no PCR permite a deteção e a amplificação exponencial de pequenas quantidades de ácido ribonucleico (RNA – *Ribonucleic acid*) ou de ácido desoxirribonucleico (DNA – *Deoxyribonucleic acid*) de vários microrganismos infecciosos nos fluidos e tecidos biológicos, sendo útil quando estes não podem ser detetados por cultura (Di Terlizzi & Platt, 2009; Levine & Levine, 2012; Nghiem & Schatzberg, 2010).

Em cães com meningoencefalite aguda de origem desconhecida, a análise do LCR por PCR deve ser considerada para a pesquisa do agente etiológico (Nghiem & Schatzberg, 2010). No entanto, não se trata de uma técnica desprovida de falhas, devendo-se avaliar os resultados criteriosamente e em conjunto com outros testes de diagnóstico realizados (Nghiem & Schatzberg, 2010; Wood et al., 2012). Assim sendo, é necessário ter em conta que um PCR negativo não descarta a presença de um agente infeccioso, uma vez que os ácidos nucleicos podem estar presentes no LCR em níveis não detetáveis ou confinados ao parênquima do SNC e, inclusivamente, pode se tratar de uma infecção transitória ou cujo agente já não se encontra presente (Di Terlizzi & Platt, 2009; Levine & Levine, 2012; Nghiem & Schatzberg, 2010).

Atualmente, existem diversas variantes do PCR convencional, com diferentes especificidades, como, por exemplo, o PCR com transcrição reversa (RT-PCR – *Reverse Transcription-PCR*) ou o PCR-multiplex (mPCR), recaindo a sua escolha sobre a natureza do agente suspeito (Nghiem & Schatzberg, 2010). O uso do PCR convencional está descrito na deteção de DNA de *Borrelia burgdorferi*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Cryptococcus neoformans* (Jalal, Nord, Lappalainen, & Evengard, 2004; Lebech & Hansen, 1992; Schatzberg et al., 2003). O RT-PCR é usado para amplificar a nucleoproteína modelo do RNA do vírus da esgana canina no LCR, sendo útil no diagnóstico precoce desta doença (Frisk, König, Moritz, & Baumgärtner, 1999). O mPCR foi utilizado, segundo um estudo, em cães com encefalite associada a toxoplasmose e neosporose (Schatzberg et al., 2003).

## **C. A utilização da CF como método analítico na doença do SNC que provoque alterações no LCR**

### **1. Citometria de fluxo**

A CF é uma técnica de rápida execução, que permite a análise de múltiplos parâmetros celulares individualmente a partir de populações heterogêneas, presentes em diferentes amostras como, por exemplo, sangue periférico, aspirados de linfonodos ou até mesmo LCR. Além disso, possibilita a determinação de contagens totais de células com uma sensibilidade e especificidade elevadas, estando cada vez mais disponível em medicina veterinária (Comazzi & Gelain, 2011; De Graaf et al., 2011; Martini et al., 2015; Picot, Guerin, Kim, & Boulanger, 2012; Rout & Avery, 2017; Tarrant, 2005).

#### **1.1. Fundamentos da técnica**

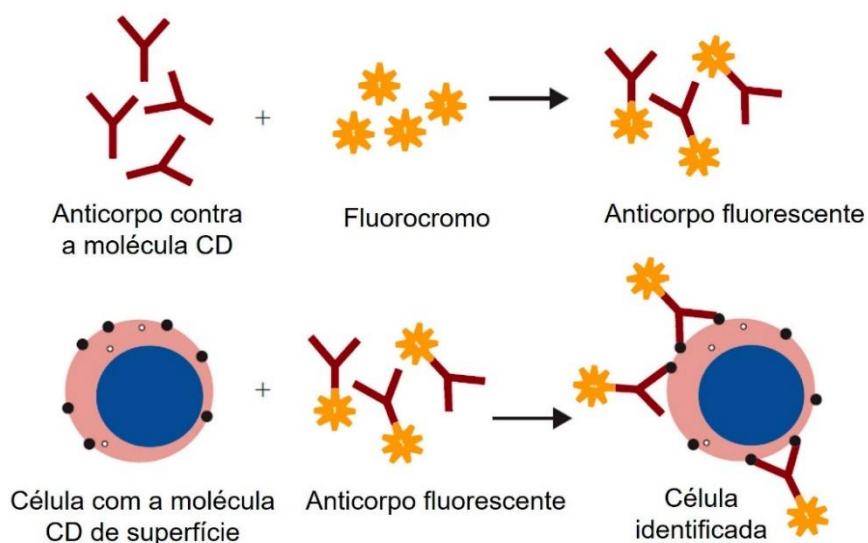
A CF é uma técnica que consiste na passagem individual de células, ou outras partículas, em suspensão numa solução tampão isotônica, por uma ou mais fontes de luz, os *lasers* (LASER – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), com o intuito de medir características particulares dessas células ou partículas (Lydyard & Grossi, 2006; Macey, 2007; Picot et al., 2012; Rout & Avery, 2017; Thomason, Archer, Mackin, Stokes, & Pinchuk, 2014; Wilkerson, 2012).

No citómetro de fluxo, a suspensão a analisar é convergida por uma elevada pressão de ar e direcionada de forma hidrodinâmica para uma única coluna muito estreita, formando-se um fluxo contínuo laminar de células/partículas (Tarrant, 2005; Tizard, 2013b; Wilkerson, 2012). As células/partículas passam, então, individual e rapidamente, pelo(s) sensor(es) do(s) *laser(s)* (Figura 11) (Macey, 2007; Tarrant, 2005). Os diferentes *lasers* emitem luz com comprimentos de onda específicos (Betters, 2015; Jaroszeski & Radcliff, 1999). À medida que a suspensão atravessa o sensor do *laser*, a luz é dispersa, devido a essa passagem, pelas células/partículas, em todas as direções (Macey, 2007; Picot et al., 2012). Na verdade, existem dois tipos de dispersão da luz do *laser*: a frontal e a lateral. A dispersão frontal da luz (FSC – *Forward Scatter*), detetada na mesma direção que o *laser*, permite recolher informação morfológica relativa ao tamanho das células. Por outro lado, a luz que dispersa lateralmente pela passagem da célula (SSC – *Side Scatter*), num ângulo de 90° em relação ao *laser*, é proporcional à granularidade (referente às estruturas internas), permitindo medir, além da sua complexidade interna, as irregularidades da sua superfície (Figura 11) (Pedreira, Costa, Lecrevisse, van Dongen, & Orfao, 2013; Picot et al., 2012; Tizard, 2013b).

Além da deteção da dispersão da luz, a CF permite que uma ampla gama de linhagens e subpopulações celulares possa ser identificada através da expressão de antígenos de

superfície, citoplasmáticos e nucleares, quando associada a técnicas que assentam na imunofenotipagem (Duque et al., 2002; Kraan et al., 2008; Tarrant, 2005). A produção de anticorpos monoclonais para antígenos expressos por linfócitos e outras células hematopoiéticas tem conduzido a avanços nas áreas da imunologia e hematologia. Os antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais têm sido categorizados por grupos de diferenciação antigénicos (CD – *Cluster of Differentiation*) (Chabanne, Bonnefont, Bernaud, & Rigal, 2000; Tarrant, 2005; Wilkerson, 2012). À suspensão de células podem ser adicionados anticorpos monoclonais fluorescentes, que ligar-se-ão às células com os antígenos específicos, de superfície ou intracelulares, permitindo a sua deteção (Figura 10) (Betters, 2015; Comazzi & Gelain, 2011; Lydyard & Grossi, 2006; Rout & Avery, 2017; Tizard, 2013b). Essa fluorescência provém de compostos que emitem luz quando excitados, os fluorocromos, que são ligados de forma covalente aos anticorpos monoclonais, sendo emitida pela célula quando esta passa pelo *laser* (Figura 10). Deste modo, pode-se realizar, a par da imunofenotipagem, a quantificação do número de células com o mesmo imunofenótipo (Jaroszeski & Radcliff, 1999; Tarrant, 2005). Existem diferentes tipos de *laser*, sendo cada um capaz de excitar fluorocromos específicos e de os levar a emitir luz com um comprimento de onda característico (Betters, 2015; Jaroszeski & Radcliff, 1999). Esta fluorescência emitida é quantitativamente proporcional à quantidade de fluorocromo ligado à célula ou constituinte celular e à sua intensidade de excitação, ou seja, é proporcional à quantidade de antígeno expresso pela célula (Ibrahim & Engh, 2007; Jaroszeski & Radcliff, 1999; Picot et al., 2012; Rout & Avery, 2017).

**Figura 10** – Representação esquemática da ligação de uma imunoglobulina a um fluorocromo e da sua utilização na identificação de moléculas CD na superfície celular (adaptado de Tizard, 2013c).



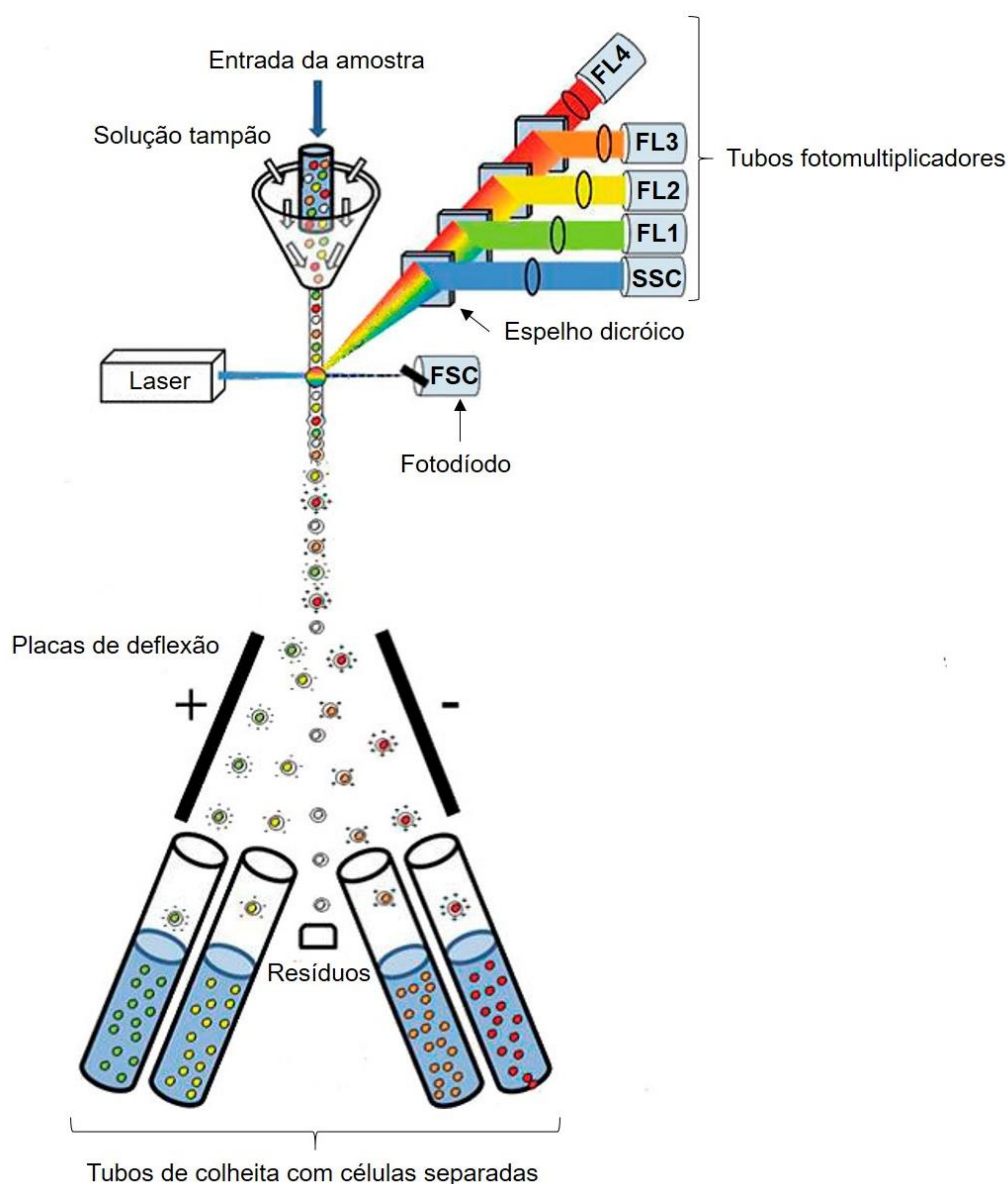
Inicialmente, a fonte de luz era restrita a um *laser* de árgon e a escolha de fluorocromos era limitada, pelo que nas análises utilizava-se a combinação de apenas um anticorpo com

fluorocromo, ou seja, havia apenas uma cor emitida, para cada avaliação. Com o aparecimento de múltiplos *lasers* e de novos fluorocromos com diferentes espectros de emissão viabilizou-se a análise da expressão de múltiplos antígenos na superfície celular, com mais de quatro cores de fluorescência, em simultâneo (Rout & Avery, 2017; Tarrant, 2005; Tizard, 2013b). Embora possam ocorrer problemas na interpretação dos resultados devido a sobreposição de cores, especialmente nos casos em que sejam utilizadas acima de seis, esta dificuldade pode ser contornada com uma combinação criteriosa dos anticorpos com os fluorocromos, procurando-se que estes emitam em comprimentos de onda diferentes (Macey, 2007; McLaughlin et al., 2008). Como exemplos de fluorocromos utilizados, existe o isotiocianato de fluoresceína (FITC), a ficoeritrina, a proteína clorofílica de peridina, a alofocianina (APC) e o iodeto de propídio (Givan, 2001; McCarthy, 2007; Wilkerson, 2012). Os fótons emitidos são colhidos por lentes, separados por filtros ou espelhos dicróicos e convertidos em impulsos elétricos por uma rede eletrônica que inclui um fotodíodo, que converte a dispersão frontal da luz, e tubos fotomultiplicadores, que convertem a dispersão lateral da luz e a fluorescência, possibilitando a sua interpretação (Figura 11). Estes sinais são processados por um conversor analógico-digital que traduz os impulsos elétricos num sinal numérico (Jaroszeski & Radcliff, 1999; Macey, 2007; Picot et al., 2012; Wilkerson, 2012). Os dados recolhidos podem ser apresentados sob a forma de histogramas, que combinam um parâmetro com o número de partículas avaliadas, ou de diagramas biparamétricos - os *dot-plots* (gráficos de pontos), que combinam os parâmetros dois a dois. Os sinais gerados pelas células/partículas são referidos como eventos, sendo que, nos *dot-plots*, cada ponto (*dot*) corresponde a um evento analisado pelo citómetro de fluxo (Jaroszeski & Radcliff, 1999; Pedreira et al., 2013).

Muitos citómetros são capazes de separar fisicamente o fluxo numa série de pequenas gotículas uniformes, por meio de vibrações de elevada frequência aplicadas à câmara da amostra por cristais piezoelétricos. A formação destas gotículas permite o isolamento das células que circulam na suspensão (Lydyard & Grossi, 2006; Macey, 2007). De acordo com as características de interesse, o operador determina por computador os parâmetros necessários para a separação das células. Quando é detetada uma célula que cumpra os requisitos determinados, a gotícula que a contém é eletricamente carregada. A polaridade da carga, positiva ou negativa, é determinada pelo critério de separação (Macey, 2007). Posteriormente, as gotículas de carga positiva são defletidas por uma placa de carga negativa, enquanto as gotículas de carga negativa são defletidas por uma placa de carga positiva, resultando em suspensões altamente purificadas, colhidas em separado. Por fim, as gotículas que não foram eletricamente carregadas são colhidas num recipiente para resíduos (Figura 11) (Macey, 2007; Wilkerson, 2012). Deste modo, podem ser obtidas da suspensão heterogénea subpopulações específicas de células ou partículas celulares, como linfócitos ou cromossomas, que podem ser caracterizadas e quantificadas (Macey, 2007; Tizard, 2013b;

Wilkerson, 2012). Esta particularidade torna a CF preferível às técnicas espectrofotométricas uma vez que estas medem características baseadas na população por inteiro (Macey, 2007). Do ponto de vista clínico, permite a seleção de células com características particulares, muitas vezes utilizada para o diagnóstico ou tratamento de uma doença (Betters, 2015).

**Figura 11** – Representação esquemática do mecanismo de análise de um citómetro de fluxo, incluindo, sequencialmente: a entrada da amostra na câmara do fluxo; a condução da suspensão celular envolvida numa solução tampão, num fluxo laminar contínuo; a passagem do fluxo pelo *laser*; a deteção frontal e lateral da luz dispersada pelas células, pelo fotodíodo e pelos tubos fotomultiplicadores; a separação do fluxo em gotículas; a aplicação de cargas elétricas sobre as mesmas; a passagem das gotículas pelas placas de deflexão e, por fim, a recolha diferencial das gotículas e resíduos (adaptado de Picot et al., 2012).



FSC – *Forward Scatter*; SSC – *Side Scatter*; FL1, FL2, FL3 e FL4 – Fluorescências de quatro comprimentos de onda diferentes.

Em comparação com outros métodos imunofenotípicos, a CF é mais fácil de executar, permite obter resultados poucas horas após a receção da amostra e, além disso, tem a capacidade de quantificar a expressão dos antígenos (Comazzi & Gelain, 2011).

## **1.2. Limitações da técnica**

O desenvolvimento da CF e o progresso da imunofenotipagem em medicina veterinária têm sido limitados em grande parte pelo preço substancial do equipamento e pela restrita disponibilidade de anticorpos monoclonais para antígenos de superfície das células, nas espécies de animais domésticos (Tarrant, 2005; Thomason et al., 2014; Wilkerson, 2012). Apenas uma minoria dos anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente, produzidos contra antígenos de humanos e roedores, reagem adequadamente com outras espécies. Atualmente, muitos anticorpos têm sido validados para o processamento de amostras caninas, particularmente associados a linfócitos T (Martini et al., 2015).

Inclusivamente, a metodologia sofisticada requer a presença de técnicos e clínicos treinados e experientes para a preparação das amostras e interpretação dos resultados, respetivamente (Tarrant, 2005; Wilkerson, 2012).

No que à análise do LCR diz respeito, estudos apontam a necessidade de haver concentrações celulares elevadas para que se obtenham resultados mais confiáveis na CF (Andrews & Schumann, 1990; Di Terlizzi & Platt, 2009; Moriarty, Wiersema, Snyder, Kotylo, & McCloskey, 1993). Não obstante, outros estudos podem comprovar que este método analítico tem grande utilidade na caracterização das subpopulações celulares presentes na amostra de LCR, mesmo quando apenas estão disponíveis baixos volumes de LCR e com poucas células. Isto pode ser relevante no diagnóstico diferencial da doença subjacente, providenciando informação adicional à obtida com as abordagens citológicas convencionais (Dux et al., 1994; Subirá et al., 2002). Além da análise estar limitada pela baixa celularidade, as células presentes no LCR são extremamente frágeis, podendo ocorrer perdas celulares que alterem o tamanho relativo das subpopulações e introduzam erros na quantificação das células e, consequentemente, nas decisões clínicas (De Graaf et al., 2011; Dux et al., 1994; Moriarty et al., 1993). Esta perda de células pode ser reduzida pela adição de um meio nutritivo ao LCR, logo após a colheita (De Graaf et al., 2011).

## **1.3. Aplicabilidade clínica**

A CF é utilizada na avaliação de *clusters* (grupo ou agregado) de células/partículas em muitas áreas científicas como hematologia, oncologia, microbiologia, transplante, oceanografia e farmacologia, sendo, no entanto, abordadas, nesta dissertação, apenas as principais aplicações no âmbito da medicina veterinária (Bonato et al., 2015; Depine-Berger, Aanei, Iobagiu, Jeraiby, & Lambert, 2016; Giaretta et al., 2013). A CF, inicialmente, era utilizada para

contagens celulares e como um meio de investigação, tendo, porém, se desenvolvido ao ponto de ser tornar uma componente integral da prática clínica em medicina veterinária, com um papel importante no diagnóstico e na monitorização de terapias (Thomason et al., 2014). A sua utilidade para a avaliação de populações celulares em humanos tem vindo a ser aplicada a outras espécies animais, incluindo a espécie canina, tendo sido estimulada a investigação no âmbito da fisiopatologia de muitas doenças e contribuído para o conhecimento dos mecanismos subjacentes, especialmente os que envolvem o sistema imunitário (Chabanne et al., 2000). Além de categorizar células individuais através de anticorpos fluorescentes, a CF permite identificar e quantificar produtos celulares como citocinas, proteínas e outras moléculas (Thomason et al., 2014).

### **1.3.1. Hematologia**

Em pouco tempo, a CF revelou-se fundamental no diagnóstico de doenças hematológicas (Comazzi & Gelain, 2011). Na verdade, o princípio da análise baseada na dispersão da luz está incorporado em diversos contadores hematológicos automáticos para as contagens de eritrócitos, plaquetas e de leucócitos (Wilkerson, 2012). Becker, Bauer e Moritz (2008) analisaram o LCR de cães através de um desses contadores automáticos e concluíram que os resultados obtidos podem ser equiparados aos dos métodos de referência, embora com algumas limitações, nomeadamente, para a contagem automática de monócitos e para amostras com apenas pleocitoses ligeiras.

Para a avaliação dos eritrócitos, as principais aplicações da CF incluem a quantificação de reticulócitos, a deteção de anticorpos anti-eritrócitos e a deteção e diagnóstico de hemoparasitoses (Thomason et al., 2014). Nas doenças hematológicas imunomediadas, a CF tem apresentado maior sensibilidade que os testes baseados na aglutinação direta, sendo uma alternativa simples e eficaz para a deteção de anticorpos na superfície dos eritrócitos (Quigley, Chelack, Haines, & Jackson, 2001; Wilkerson, 2012; Wilkerson et al., 2000). Quanto às hemoparasitoses, a CF tem sido utilizada para o diagnóstico de babesiose em cães permitindo detetar e quantificar rapidamente o número de células parasitadas (Bicalho, Ribeiro, & Martins-Filho, 2004).

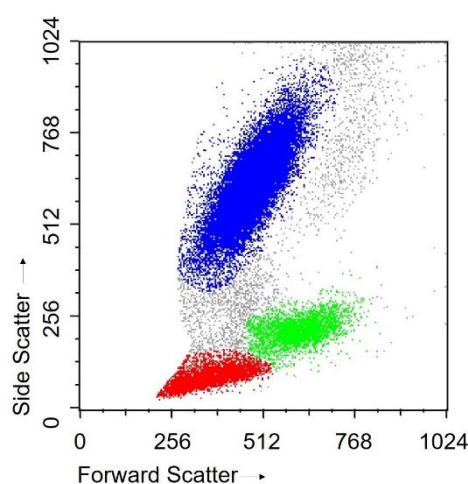
A CF permite realizar uma avaliação morfológica e funcional das plaquetas em cães, uma vez que permite a quantificação de plaquetas imaturas, a deteção de anticorpos anti-plaquetas e a deteção de plaquetas ativadas, tendo sido utilizada em casos de trombocitopenia imunomediada (Thomason et al., 2014; Wilkerson, 2012).

### **1.3.2. Imunologia**

Os leucócitos são responsáveis pela defesa do organismo e atuam segundo um sistema imunitário inato, que inclui os neutrófilos e macrófagos, e um sistema imunitário adquirido, que engloba grande parte dos linfócitos (Tizard, 2013c, 2013d). O tipo de leucócitos mais comum no sangue periférico de cães adultos saudáveis são os neutrófilos maduros, com cerca de

70% nas contagens celulares diferenciais. Os linfócitos ocupam o segundo lugar com uma média de 20%, os monócitos constituem cerca de 5% e os eosinófilos, normalmente, estão abaixo dos 5% do total de leucócitos no sangue periférico (Zabolotzky & Walker, 2014). Os neutrófilos participam na primeira linha de defesa contra microrganismos invasores, lesão tecidual ou qualquer estímulo inflamatório. Por sua vez, os macrófagos, provenientes dos monócitos, além de destruírem os microrganismos invasores, promovem respostas de imunidade inata e adquirida, como a produção de citocinas, controlam a inflamação e contribuem para a recuperação tecidual após lesão (Tizard, 2013c). Os linfócitos, mesmo que apresentem uma estrutura semelhante entre si, constituem diversas subpopulações, sendo as duas principais os linfócitos B e T. Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos enquanto os linfócitos T participam nas respostas imunitárias mediadas por células. As diferentes populações de leucócitos podem ser identificadas pela análise do fenótipo que consiste no padrão formado pelas numerosas moléculas celulares de superfície que são expressas pelas células e catalogadas segundo o sistema CD, referido anteriormente (Tizard, 2013d). Num gráfico biparamétrico, cada população celular pode ser identificada de acordo com duas características avaliadas, resultando numa distribuição de eventos com áreas definidas. O gráfico 1 representa um *dot-plot* ilustrativo da distribuição dos eventos segundo as características da FSC e SSC da luz pelas células da amostra analisada, neste caso, de sangue periférico canino. De acordo com os parâmetros avaliados, os neutrófilos apresentam valores elevados tanto na dispersão frontal como na lateral, visto que se tratam de células de grande tamanho e de citoplasma granular, que atribui uma complexidade interna superior à das restantes populações leucocitárias. Os monócitos são ligeiramente maiores e com menor complexidade citoplasmática, estando, porém, acima dos linfócitos que são as células de menor tamanho e com pouca complexidade interna (Rout & Avery, 2017).

**Gráfico 1** – *Dot-plot* resultante da avaliação de sangue periférico canino com identificação das principais populações leucocitárias, nomeadamente neutrófilos (azul), monócitos (verde) e linfócitos (vermelho), de acordo com as características da FSC e SSC da luz pelas células (original).





Têm sido utilizados anticorpos monoclonais contra as moléculas CD3 para a identificação de linfócitos T, CD21, para a de linfócitos B, e CD14, para a de monócitos (Bueno, Mello, Menezes, Dutra, & Santos, 2005; Duque et al., 2002; Villaescusa, García-Sancho, Rodríguez-Franco, & Sainz, 2012). Dentro dos linfócitos T, salientam-se as moléculas CD4, encontradas, sobretudo, nos linfócitos T auxiliares ( $T_H$  – *T helper*) e as CD8, expressas apenas nos linfócitos T citotóxicos ( $T_C$ ), sendo utilizados anticorpos monoclonais contra estas moléculas para a identificação destas subpopulações (Bismarck et al., 2012; Tizard, 2013a, 2013d; Villaescusa et al., 2012). Nos cães, as moléculas CD4 são também expressas nos neutrófilos e macrófagos, mas não nos monócitos (Moore et al., 1992; Tizard, 2013a, 2013d). No sangue periférico de cães saudáveis, existe maior percentagem de linfócitos T ( $CD3^+$ ) do que linfócitos B ( $CD21^+$ ) e, dos linfócitos T, é maior a percentagem dos  $T_H$  ( $CD4^+$ ) que a dos  $T_C$  ( $CD8^+$ ) (Bund et al., 2010; Faldyna, Levá, Knötigová, & Toman, 2001; Platt et al., 2013; Villaescusa et al., 2012). A distribuição das subpopulações de linfócitos no sangue periférico de cães varia de acordo com a sua idade, raça e, possivelmente, também com o seu género (Faldyna et al., 2001; Villaescusa et al., 2012). Nos animais domésticos, a análise de subpopulações de linfócitos T do sangue periférico é tipicamente utilizada como ferramenta de pesquisa para avaliação da imunocompetência, do efeito de fármacos no sistema imunitário e da progressão de doenças infecciosas (Tarrant, 2005).

Foi realizado um estudo, recentemente (Platt et al., 2013), no qual foram utilizados painéis de sete cores para a caracterização fenotípica de linfócitos caninos com expressão de múltiplos marcadores, por CF. Está, ainda, descrito o uso da CF para a deteção de anticorpos anti-neutrófilos em cães com neutropenia imunomediada (Weiss, 2007a, 2007b).

### **1.3.3. Oncologia**

As aplicações mais comuns da CF em oncologia veterinária são a quantificação do conteúdo de DNA nas células neoplásicas e a imunofenotipagem de malignidades hematopoiéticas em cães. A análise de DNA é útil na avaliação do comportamento biológico de várias neoplasias, dado que permite analisar o grau de aneuploidia e a capacidade proliferativa das células neoplásicas e identificar a fase do ciclo celular em que se encontram. No entanto, esta análise ao DNA não tem sido muito aceite devido ao prognóstico variável (Culmsee & Nolte, 2002; Reggeti & Bienzle, 2011; Wilkerson, 2012). Nos últimos anos, a CF tem sido cada vez mais aplicada, essencialmente, para a imunofenotipagem de doenças mieloproliferativas e linfomas, sendo particularmente útil na diferenciação entre leucemias, agudas e crónicas, mieloides e linfoides (Culmsee & Nolte, 2002; Reggeti & Bienzle, 2011; Rout & Avery, 2017; Tarrant, 2005). Além disso, permite obter informações como o tamanho das células e a expressão de antigénios específicos, importantes no estabelecimento do prognóstico em certos tipos de linfoma e leucemia (Rout & Avery, 2017; Wilkerson, 2012). A imunofenotipagem de amostras de sangue venoso periférico e/ou aspirados da medula óssea

tem contribuído para o diagnóstico de leucemia aguda e crônica em diversas espécies, incluindo a espécie canina (Elliott, 2016; McClure, Young, Fiste, Sharkey, & Lunn, 2001; Tarrant, 2005; Weiss, 2001). No que concerne às células leucêmicas, a imunofenotipagem permite definir a linhagem celular e o estado de maturação celular (Culmsee & Nolte, 2002; Reggeti & Bienzle, 2011; Wilkerson, 2012). Diversos estudos têm demonstrado que a CF é um meio de diagnóstico útil na classificação do imunofenótipo de linfomas caninos, como sendo de linfócitos B ou T, a partir de aspirados de linfonodos (Avery et al., 2014; Joetzke, Eberle, Nolte, Mischke, & Simon, 2012; Martini et al., 2015; Thalheim, Williams, Borst, Fogle, & Suter, 2013). A CF também tem sido utilizada em casos de osteossarcoma e carcinoma das células de transição (Thomason et al., 2014).

#### **1.3.4. Outras aplicações**

Além das aplicações referidas, a CF tem sido utilizada em casos de deficiência na adesão leucocitária, pioderma profundo, lúpus eritematoso sistêmico canino e leishmaniose (Chabanne et al., 1995; Silva et al., 2013; Sprucek, Toman, Faldyna, & Svoboda, 2007; Trowald-Wigh, Johannisson, & Hakansson, 1993). Uma recente aplicação da CF em cães trata-se da monitorização farmacodinâmica de fármacos imunossupressores como a ciclosporina (Thomason et al., 2014).

#### **1.3.5. Aplicações com base na avaliação do LCR**

Estudos sugerem que uma avaliação imunofenotípica de multiparâmetros por CF de amostras de LCR pode melhorar a eficiência de detecção do envolvimento do SNC, devido à elevada especificidade e sensibilidade (Kraan et al., 2008). Embora seja utilizada em larga escala na medicina humana, a análise do LCR por CF com técnicas de imunofenotipagem tem sido pouco descrita na medicina veterinária (Di Terlizzi & Platt, 2009; Duque et al., 2002). Duque e os seus colaboradores (2002) examinaram por CF o imunofenótipo das células mononucleares do LCR em cães saudáveis comparando com uma amostra de sangue periférico correspondente. Os resultados obtidos indicaram haver, ao nível do LCR, maior percentagem de linfócitos T do que linfócitos B, com predominância dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> sobre os CD8<sup>+</sup>. Estes resultados são concordantes com os previamente descritos num estudo semelhante (Tipold, Moore, Jungi, Sager, & Vandeveld, 1998). Quanto às subpopulações de linfócitos T, no mesmo estudo (Duque et al., 2002), ainda que a percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> tenha sido, em média, consistentemente superior à de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, concluiu-se que a distribuição destas subpopulações pode ser muito variável no LCR, uma vez que, em alguns casos analisados, mesmo na ausência de doença, a percentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> excedeu a de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Esta variação individual já havia sido igualmente descrita num estudo anterior (Tipold et al., 1998), tendo sido verificada não só entre cães de raças e idades diferentes, como também entre cães da mesma raça. Consequentemente, para a obtenção

de resultados significativos, é recomendada a avaliação repetida de amostras de sangue e LCR do mesmo indivíduo, durante o progresso de uma doença do SNC (Tipold et al., 1998). No âmbito da oncologia veterinária, células neoplásicas podem também ser identificadas no LCR, estando já descritos casos de linfoma canino ao nível do SNC, classificados por imunofenotipagem, como sendo de células B ou T utilizando amostras de LCR (Di Terlizzi & Platt, 2009).

## **2. Parte prática**

### **2.1. Objetivos**

Esta dissertação foi realizada com o intuito de aferir a importância da avaliação do LCR através da exploração de técnicas laboratoriais como meios de diagnóstico, pouco utilizadas na área da neurologia, em medicina veterinária, nomeadamente a CF associada a técnicas de imunofenotipagem. A abordagem da CF teve como finalidade adquirir conhecimentos sobre as noções básicas da técnica como o funcionamento do citómetro de fluxo, o modo de preparação das amostras para posterior aquisição e a interpretação dos resultados obtidos por meio de gráficos biparamétricos.

A componente prática descrita nesta dissertação consistiu na análise de amostras de LCR, e de sangue periférico, por CF, com o intuito de perceber como se distribuem as diferentes populações de leucócitos, nomeadamente, neutrófilos e monócitos/macrófagos, no sentido de avaliar desvios que justifiquem situações de doença com tradução no LCR, e, através da imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos, perceber, também, que tipo de imunidade domina, se citotóxica (linfócitos T CD8<sup>+</sup>), auxiliadora (linfócitos T CD4<sup>+</sup>) ou humoral (linfócitos B).

### **2.2. Materiais**

Foram obtidas doze amostras, nove das quais fornecidas pelo Hospital Veterinário do Restelo e, as restantes três, provenientes do Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade de Lisboa. As colheitas de LCR foram realizadas pelos Médicos Veterinários responsáveis, de cada um dos hospitais veterinários, entre 23 de setembro de 2016 e 25 de abril de 2017. A par das amostras de LCR, foram feitas colheitas de sangue periférico, necessárias para a realização de uma correta análise por CF, uma vez que os resultados obtidos servem como referência para a interpretação das populações celulares que possam surgir na análise do LCR.

Foram selecionados três casos clínicos, não acompanhados pelo autor, correspondentes a três das doze amostras de LCR obtidas, exemplificativos do contributo que a CF pode ter na determinação do diagnóstico definitivo ou na exclusão de diagnósticos diferenciais. Todos os

casos selecionados foram de animais avaliados no Hospital Veterinário do Restelo, sendo dois deles enviados de outra clínica. Na descrição destes casos foi tida em consideração as informações disponíveis na história clínica bem como dos exames complementares realizados, com especial atenção à análise do LCR realizada pelo Médico Veterinário responsável. Esta análise do LCR englobou, como descrito anteriormente, uma avaliação macroscópica, uma análise quantitativa e uma avaliação citológica microscópica. A avaliação citológica foi realizada por meio de esfregaços, um par por amostra colhida, de líquido concentrado por sedimentação.

### 2.2.1. Caso Clínico 1

Um canídeo macho de 22,6 kg, Labrador Retriever, nascido em outubro de 2015, veio de outra clínica com indicação para colheita e análise de LCR. A história clínica disponibilizada indica que, aos 5 meses de idade, surgiu em consulta em cifose, aparentemente com dor abdominal, tendo evoluído para um quadro de piroxia, dor cervical e diminuição da propriocepção num dos membros torácicos. Nessa altura foi feito despiste de hemoparasitoses e infeção por *Neospora*, ambos com resultados negativos. A principal suspeita de diagnóstico foi uma MARC, tendo recebido tratamento com corticosteroides, ao qual respondeu positivamente, com desmame durante 5 meses. Recidivou após o término do tratamento, em fins de junho de 2016, tendo-o retomado até janeiro de 2017. No mês seguinte surgiu à consulta com sinais de dor, principalmente toracolombar, em cifose, com 39,5 °C de temperatura e apetite caprichoso. No hemograma tinha sido observado leucocitose neutrofílica ( $24,3 \times 10^3$  leucócitos/ $\mu$ l; intervalo de referência,  $6,0 - 17,0 \times 10^3$  leucócitos/ $\mu$ l), sem ter apresentado alterações nas análises bioquímicas ao sangue. Havia sido administrado meloxicam e tramadol para manejo de dor e piroxia.

A análise de LCR não revelou alterações significativas (tabela 3), tendo a avaliação citológica apresentado uma escassa celularidade, com raros eritrócitos e raros neutrófilos não degenerados. Não foram detetados agentes infecciosos nem células com características de malignidade.

**Tabela 3** – Resultados da avaliação macroscópica e quantitativa do LCR do caso clínico 1.

Exame	Parâmetro	Resultado	Características normais
<b>Macroscópico</b>	Cor	Incolor	Incolor
	Aspeto (turvação)	Límpido	Límpido
<b>Quantitativo</b>	Contagem de eritrócitos	Raros/ $\mu$ l	Raros/ $\mu$ l
	CTCN	Raras/ $\mu$ l	0 – 5/ $\mu$ l
	Proteínas Totais	15 mg/dl	≤30 mg/dl
	Densidade	1004	1004 – 1006

CTCN – Contagem total de células nucleadas

### 2.2.2. Caso Clínico 2

Um canídeo macho de 25 kg, Boxer, nascido em abril de 2012, veio com indicação para a realização de TC e colheita de LCR. A história clínica disponibilizada indica que o animal apresentava convulsões, apatia, andamento em círculos para o lado direito e dor cervical desde há 4 meses relativamente ao dia da consulta, em janeiro de 2017. Havia iniciado corticoterapia há 4 meses e fenobarbital há um mês e meio. Tinham sido realizados hemograma e análises bioquímicas, tendo revelado anemia ligeira e aumento das transaminases hepáticas.

As conclusões da TC indicam a presença de uma lesão encefálica, compatível com neoplasia intra-axial do SNC ou extra-axial com expansão intra-axial. A tabela 4 mostra os resultados da análise macroscópica e quantitativa do LCR. A sua avaliação citológica revelou a existência de uma pleocitose mista moderada, representada essencialmente por macrófagos e neutrófilos não degenerados e, em menor número, linfócitos maduros. A par da pleocitose, não foram detetados agentes infecciosos nem células com características de malignidade.

**Tabela 4** – Resultados da avaliação macroscópica e quantitativa do LCR do caso clínico 2.

Exame	Parâmetro	Resultado	Características normais
<b>Macroscópico</b>	Cor	Incolor	Incolor
	Aspeto (turvação)	Límpido	Límpido
<b>Quantitativo</b>	Contagem de eritrócitos	50/ $\mu$ l	Raros/ $\mu$ l
	CTCN	120/ $\mu$ l	0 – 5/ $\mu$ l
	Proteínas Totais	30 mg/dl	$\leq$ 30 mg/dl
	Densidade	1006	1004 – 1006

CTCN – Contagem total de células nucleadas

### 2.2.3. Caso Clínico 3

Um canídeo fêmea de 33 kg, Boiadeiro de Berna, nascido em agosto de 2009, apresentou um quadro de claudicação do membro torácico esquerdo com dor na região sub-escapular, que progrediu para tetraparesia com dor cervical. O hemograma revelou apenas uma ligeira linfopenia e nas análises bioquímicas a fosfatase alcalina sérica apresentou valores elevados. Foi realizada TC e colheita de LCR. O relatório da TC apontou a existência de lesões na região cervical, mais especificamente nos espaços intervertebrais C5 – C6 e C6 – C7, compatíveis com protrusões discais (hérnia tipo II de Hansen), de baixo volume com ligeira compressão da medula espinhal. A análise de LCR não revelou alterações significativas (tabela 5). A avaliação citológica apresentou uma escassa celularidade, com raros eritrócitos e raros neutrófilos não degenerados, não tendo sido detetados agentes infecciosos nem células com características de malignidade.

**Tabela 5** – Resultados da avaliação macroscópica e quantitativa do LCR do caso clínico 3.

Exame	Parâmetro	Resultado	Características normais
<b>Macroscópico</b>	Cor	Incolor	Incolor
	Aspeto (turvação)	Límpido	Límpido
<b>Quantitativo</b>	Contagem de eritrócitos	Raros/ $\mu$ l	Raros/ $\mu$ l
	CTCN	Raras/ $\mu$ l	0 – 5/ $\mu$ l
	Proteínas Totais	15 mg/dl	$\leq$ 30 mg/dl
	Densidade	1004	1004 – 1006

CTCN – Contagem total de células nucleadas

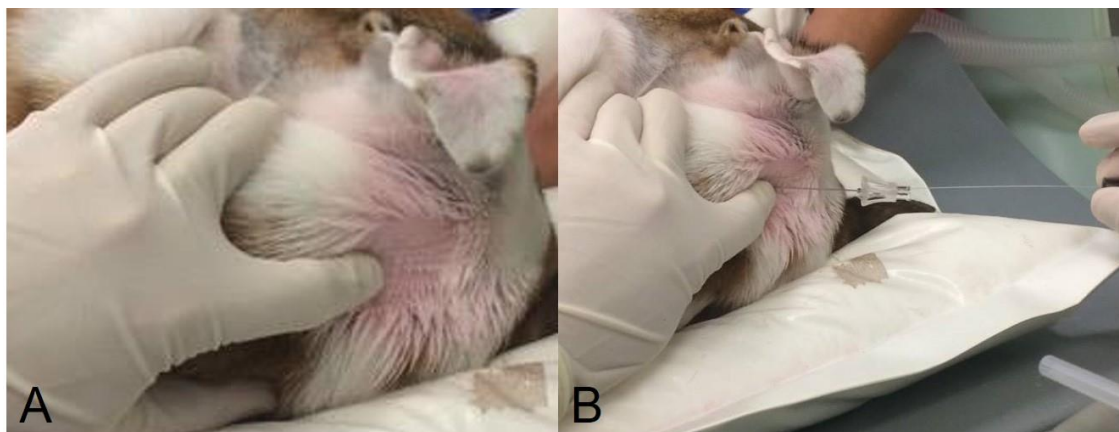
Na consulta seguinte, apresentou-se deprimida, com dor inespecífica e fraqueza dos membros pélvicos com tremores ocasionais. Todavia, ortopédica e neurologicamente não apresentava alterações. O hemograma e as análises bioquímicas demonstraram as mesmas alterações verificadas na primeira consulta. Fez despiste de doenças infecciosas com testes serológicos, cujas titulações de anticorpos foram positivas para IgM anti-*Toxoplasma gondii* e para IgG anti-*Rickettsia conorii*. O doseamento das hormonas T4 total e TSH apresentou-se dentro dos valores normais. Iniciou-se terapêutica com doxiciclina e clindamicina em consultas diferentes. Não foram observadas alterações na apresentação clínica do animal, pelo que foi indicado para a realização de RM num serviço externo ao Hospital, não havendo informação dos resultados obtidos, até ao momento da recolha de dados para esta dissertação.

## 2.3. Metodologia

### 2.3.1. Técnica de colheita utilizada

As amostras de LCR respeitantes aos casos apresentados foram obtidas por punção da cisterna magna, tendo sido realizada a técnica segundo os passos descritos anteriormente. Os animais foram submetidos a anestesia geral, intubados, colocados em decúbito lateral e preparados assepticamente. Com o pescoço flexionado, aproximadamente 90°, e o focinho ligeiramente elevado, procedeu-se à identificação dos pontos de referência anatómicos para determinação do local a puncionar (Figura 12A) e posterior inserção da agulha. O modo utilizado para a determinação do local da punção é uma alternativa à já referida, tendo sido, neste caso, desenhado um triângulo a partir da protuberância occipital externa e das asas do atlas, cujo centro indica onde deve ser inserida a agulha. Esta variante está também descrita na literatura (Wamsley & Alleman, 2004). O estilete da agulha foi posteriormente removido (Figura 12B) e o LCR foi colhido por sucção suave, através de uma seringa, à medida que as gotas surgiam na base da agulha (Figura 13). Foram utilizadas agulhas Spinocan de 40 ou 88 mm, dependendo do tamanho do animal, com estilete, para a punção e seringas de 2 ml para a recolha.

**Figura 12** – A – Determinação dos pontos de referência anatômicos para a colheita de LCR. B – Remoção do estilete na colheita de LCR (fotografias originais).



**Figura 13** – Recolha do LCR por sucção suave, através de uma seringa (fotografia original).



### 2.3.2. Acondicionamento e preparação das amostras

As amostras obtidas apresentavam um volume de 0,6 ml de LCR, nos dois primeiros casos, e de 0,5 ml, no terceiro caso. Após a colheita, foram armazenadas em tubos de Eppendorf, aos quais foram adicionados 1 ml de um meio nutritivo (RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*) para atrasar a degenerescência celular inerente à fragilidade que as células apresentam ao nível do LCR.

A CF e a imunofenotipagem foram realizadas no *CEDOC - Chronic Diseases Research Center, Immunology, NOVA Medical School*. As amostras foram analisadas num citómetro de fluxo FACSCalibur (BD) seguindo um protocolo pré-estabelecido. Em cada caso, são colocados 100 µl de amostra num tubo próprio para o efeito e adicionado o anticorpo monoclonal de superfície a investigar. Segue-se um período de incubação, de acordo com o tempo prescrito, à temperatura ambiente. Posteriormente, o tubo é preenchido com uma solução tampão fosfato-salino (PBS – *Phosphate buffered saline*) e submetido a centrifugação durante 5 minutos, a 1500 rpm. O sobrenadante é rejeitado, com a remoção do excesso de PBS, as células são novamente suspensas na solução e a lavagem é repetida. Após este

procedimento, são adicionados 500 µl de BD FACS FLOW, que se trata de uma solução tampão adequada à suspensão das células, utilizada em análises por CF. A amostra preparada é submetida a uma agitação no vórtex antes de ser adquirida no citómetro de fluxo FACSCalibur da BD de acordo com os protocolos de aquisição.

### **2.3.3. Análise por CF**

Na análise por CF, as principais populações leucocitárias nas amostras de sangue periférico e LCR foram identificadas e quantificadas com base nas características da FSC e SSC da luz, resultante da passagem das células pelo *laser*. Não tendo utilizado anticorpos contra antigénios em particular, foi realizada também a imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos B e T. Diversos anticorpos monoclonais podem ser selecionados tendo em conta a variedade de moléculas CD de superfície expressas pelas diferentes subpopulações. Na avaliação das amostras dos casos em estudo foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD3 conjugados com FITC para a identificação dos linfócitos T e anticorpos monoclonais anti-CD4 conjugados com APC para a identificação dos linfócitos T<sub>H</sub> (CD4<sup>+</sup>), tendo sido considerados como linfócitos T<sub>C</sub> (CD8<sup>+</sup>) os negativos para CD4, dado que não foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD8. Do mesmo modo, serão considerados como linfócitos B, os negativos para CD3. Selecionados os anticorpos monoclonais a usar e preparada a amostra para que possa ser adquirida no citómetro de fluxo, foi realizada a construção de *templates* de aquisição e análise, definindo a estratégia de análise em função do que se pretendia avaliar. Neste caso, tinha como finalidade avaliar as populações e subpopulações de leucócitos no sangue periférico e no LCR. Os dados foram analisados com o *software* Paint-A-Gate Pro e Cell-Quest Pro (BD Biosciences).

## **2.4. Resultados**

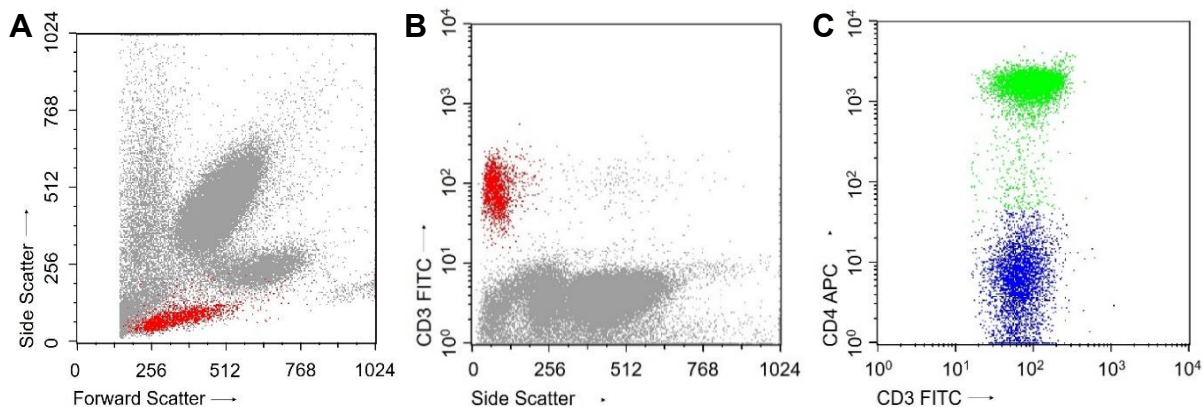
Em todos os casos clínicos, nos resultados da CF foram obtidas as percentagens relativas das populações de leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) e subpopulações de linfócitos (B, T<sub>H</sub> e T<sub>C</sub>) no sangue periférico, enquanto no LCR, foram apenas obtidas as percentagens de linfócitos T<sub>H</sub> e T<sub>C</sub>. Não obstante, os gráficos biparamétricos obtidos da análise das amostras de LCR permitem identificar, pela distribuição dos eventos/células, algumas populações e subpopulações leucocitárias que não foram quantificadas.

### **2.4.1. Caso Clínico 1**

Os resultados obtidos neste caso indicam que a população de neutrófilos no sangue constitui 76,48% das células nucleadas, os monócitos, 12,00% e os linfócitos, 11,00% (gráfico 2A). Dentro dos linfócitos, 59,58% são do tipo T, sendo os restantes 40,42% do tipo B (gráfico 2B). Por sua vez, da totalidade de linfócitos T, 60,44% foram positivos para CD4, correspondendo aos linfócitos T<sub>H</sub>, e 39,56% foram negativos para CD4, correspondendo aos linfócitos T<sub>C</sub> que serão considerados como positivos para CD8 (gráfico 2C).



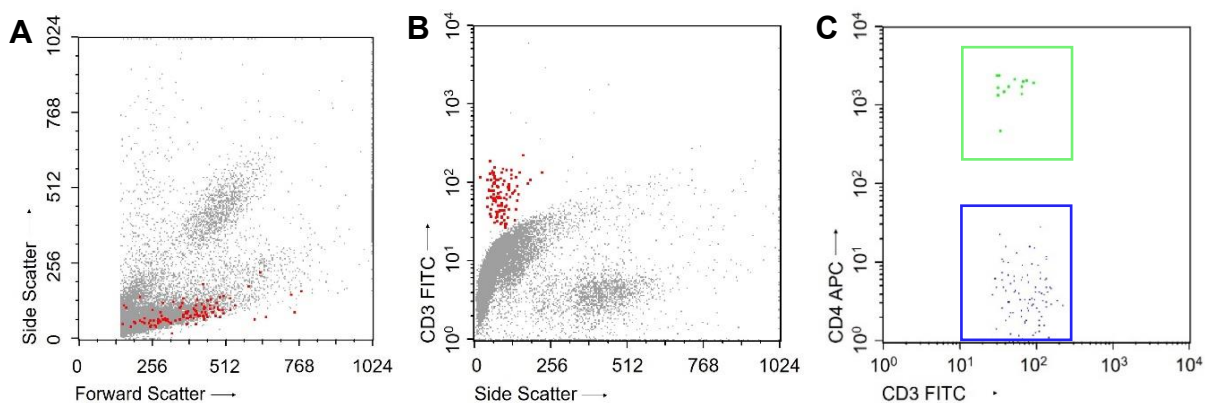
**Gráfico 2 – Dot-plots** resultantes da análise do sangue apresentando: a distribuição de leucócitos, de acordo com as características da FSC e SSC da luz pelas células, com destaque da população de linfócitos a vermelho (A); a distribuição de linfócitos, de acordo com as características da SSC da luz pelas células e identificação da subpopulação de linfócitos T pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD3-FITC, destacada a vermelho (B); a distribuição dos linfócitos T, células CD3-FITC positivas e CD4-APC positivas (células CD4<sup>+</sup>, destacadas a verde, e as CD4<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup>), destacadas a azul (C)).



FITC – Isotiocianato de fluoresceína; APC – Alociocianina.

Ao nível do LCR, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> constituem 12,15% da totalidade de linfócitos T, sendo os CD4<sup>-</sup> os restantes 87,85% (gráfico 3C). Embora não quantificada, é identificável uma população celular com características de neutrófilos (gráfico 3A).

**Gráfico 3 – Dot-plots** resultantes da análise do LCR apresentando: a distribuição de leucócitos, segundo as características da FSC e SSC da luz pelas células, com destaque da população de linfócitos a vermelho (A); a distribuição de linfócitos, de acordo com as características da SSC da luz pelas células e identificação da subpopulação de linfócitos T pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD3-FITC, destacada a vermelho (B); a distribuição dos linfócitos T, células CD3-FITC positivas e CD4-APC positivas (células CD4<sup>+</sup>, destacadas a verde, e as CD4<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup>), destacadas a azul (C)).

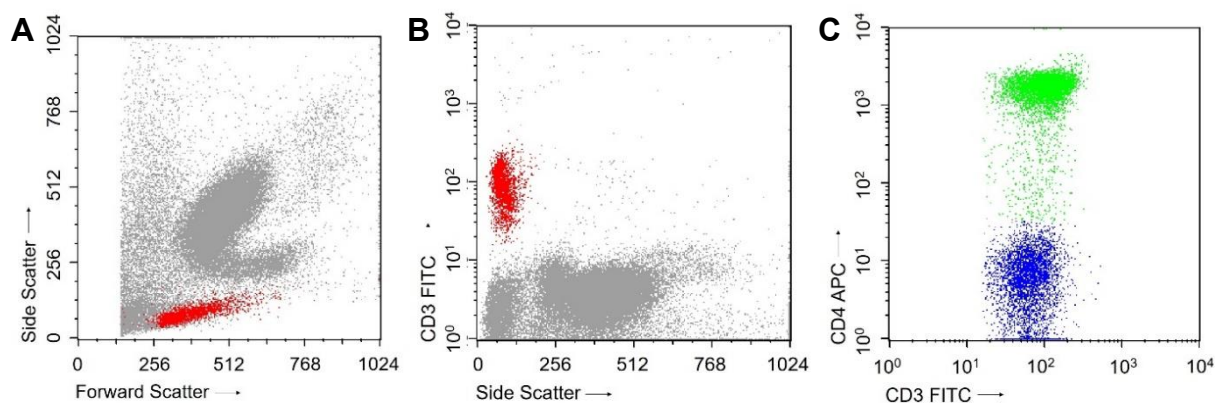


FITC – Isotiocianato de fluoresceína; APC – Alociocianina.

### 2.4.2. Caso Clínico 2

No segundo caso, a análise ao sangue demonstrou haver uma população de neutrófilos de 78,43%, uma de monócitos de 8,51% e uma de linfócitos de 6,66% (gráfico 4A). Dos linfócitos, 54,11% são do tipo T e 45,89% do tipo B (gráfico 4B). Quanto ao subtipo de linfócitos T, os resultados mostram que 63,40% são CD4<sup>+</sup> (linfócitos T<sub>H</sub>) e 36,60% são CD4<sup>-</sup> (linfócitos T<sub>C</sub>) (gráfico 4C).

**Gráfico 4** – *Dot-plots* resultantes da análise do sangue apresentando: a distribuição de leucócitos, segundo as características da FSC e SSC da luz pelas células, com destaque da população de linfócitos a vermelho (A); a distribuição de linfócitos, de acordo com as características da SSC da luz pelas células e identificação da subpopulação de linfócitos T pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD3-FITC, destacada a vermelho (B); a distribuição dos linfócitos T, células CD3-FITC positivas e CD4-APC positivas (células CD4<sup>+</sup>, destacadas a verde, e as CD4<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup>), destacadas a azul (C)).

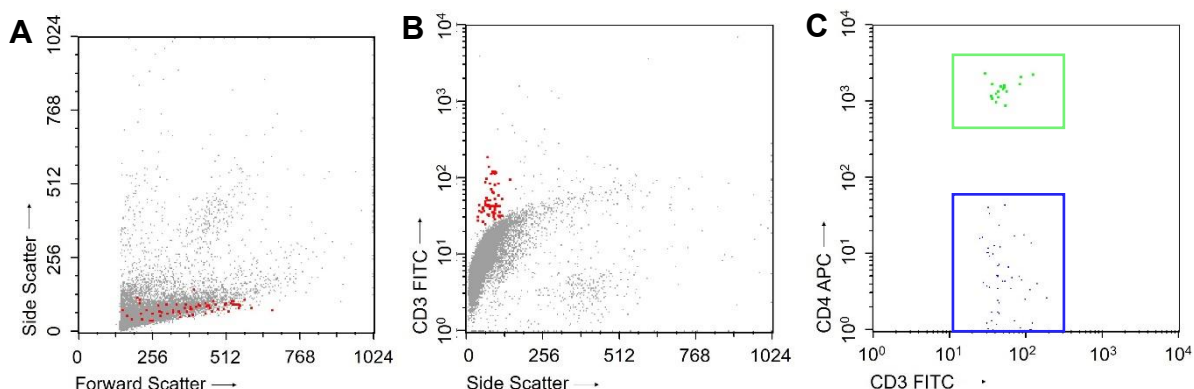


FITC – Isotiocianato de fluoresceína; APC – Aloficocianina.

Os resultados da análise de LCR, por sua vez, apresentaram valores de 25,00% para linfócitos T<sub>H</sub> (CD4<sup>+</sup>) e de 75,00% para linfócitos T<sub>C</sub> (CD4<sup>-</sup>) (gráfico 5C). Neste caso, não são facilmente identificáveis as populações de neutrófilos nem de macrófagos (gráfico 5A).

**Gráfico 5** – *Dot-plots* resultantes da análise do LCR apresentando: a distribuição de leucócitos, segundo as características da FSC e SSC da luz pelas células, com destaque da população de linfócitos a vermelho (A); a distribuição de linfócitos, de acordo com as características da SSC da luz pelas células e identificação da subpopulação de linfócitos T pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD3-FITC, destacada a vermelho (B); a

distribuição dos linfócitos T, células CD3-FITC positivas e CD4-APC positivas (células CD4<sup>+</sup>, destacadas a verde, e as CD4<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup>), destacadas a azul (C)).

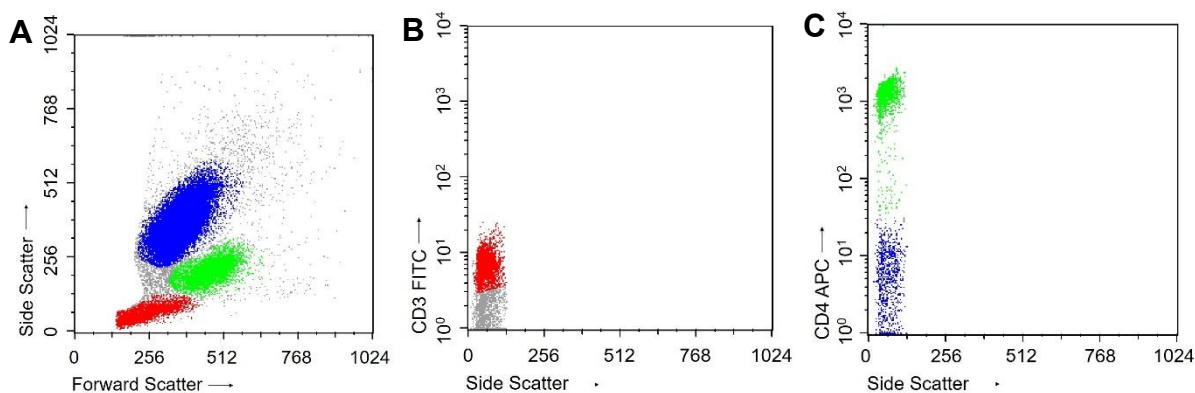


FITC – Isotiocianato de fluoresceína; APC – Aloficocianina.

### 2.4.3. Caso Clínico 3

No terceiro caso, os resultados obtidos pela análise do sangue revelaram haver 70,70% de neutrófilos, 12,62% de monócitos e 11,47% de linfócitos (gráfico 6A). Da população de linfócitos, 61,60% das células são linfócitos T (gráfico 6B), dos quais 65,18% mostraram ser CD4<sup>+</sup> e 34,82%, CD4<sup>-</sup> (gráfico 6C). Os linfócitos B correspondem aos restantes 38,40%.

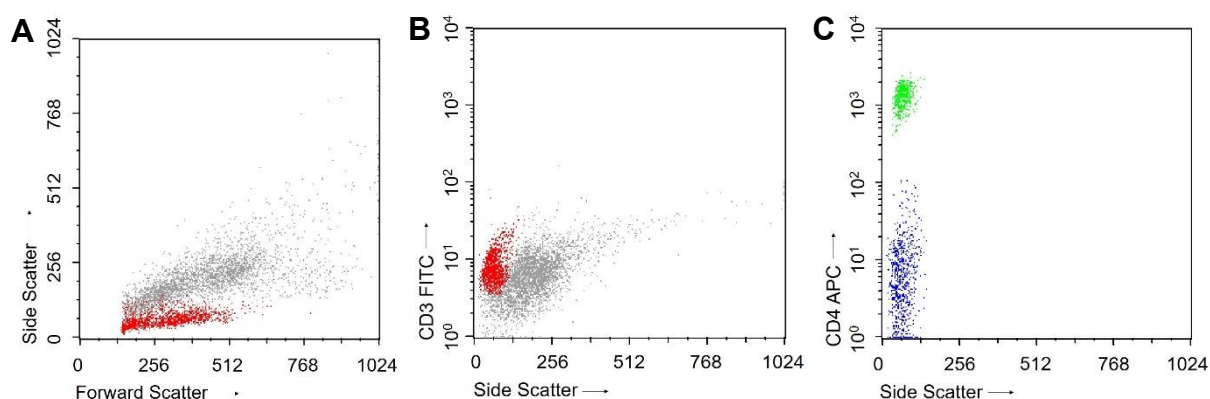
**Gráfico 6 – Dot-plots** resultantes da análise do sangue apresentando: a distribuição de leucócitos, segundo as características da FSC e SSC da luz pelas células, com destaque a azul da população de neutrófilos, a verde da de monócitos e a vermelho da de linfócitos (A); a distribuição de linfócitos, de acordo com as características da SSC da luz pelas células e identificação da subpopulação de linfócitos T pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD3-FITC, destacada a vermelho (B); a distribuição dos linfócitos T, segundo as características da SSC da luz pelas células e identificação dos linfócitos T<sub>H</sub> pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD4-APC, estando as células CD4<sup>+</sup>, destacadas a verde, e as CD4<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup>), destacadas a azul (C).



FITC – Isotiocianato de fluoresceína; APC – Aloficocianina.

Quanto aos valores obtidos na análise de LCR, 37,64% dos linfócitos T foram positivos para CD4 e 62,36% foram negativos (gráfico 7C). No gráfico 7A é possível identificar uma população de células com características de macrófagos.

**Gráfico 7** – *Dot-plots* resultantes da análise do LCR apresentando: a distribuição de leucócitos, segundo as características da FSC e SSC da luz pelas células, com destaque da população de linfócitos a vermelho (A); a distribuição de linfócitos, de acordo com as características da SSC da luz pelas células e identificação da subpopulação de linfócitos T pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD3-FITC, destacada a vermelho (B); a distribuição dos linfócitos T, segundo as características da SSC da luz pelas células e identificação dos linfócitos T<sub>H</sub> pelos anticorpos monoclonais fluorescentes anti-CD4-APC, estando as células CD4<sup>+</sup>, destacadas a verde, e as CD4<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup>), destacadas a azul (C).



FITC – Isotiocianato de fluoresceína; APC – Alofocianina.

## 2.5. Discussão

Atendendo ao reduzido número de casos na clínica diária que tenham indicação para a colheita de LCR e à quantidade limitada de LCR que pode ser colhido, o número de amostras que tivemos à nossa disposição para análise por CF foi muito baixo, inviabilizando a realização de um estudo que incluísse análises estatísticas. Adicionalmente, o facto da maioria das amostras obtidas apresentar pouca ou rara celularidade impediu a obtenção de resultados suficientemente ilustrativos da informação que este meio de diagnóstico pode oferecer. A determinação da celularidade é influenciada por diversos fatores como o local e a técnica de colheita, a cronicidade da afeção e o armazenamento da amostra. O reduzido volume de LCR disponibilizado para a CF (0,5 – 0,6 ml) poderá ter contribuído para a baixa celularidade detetada na maioria dos casos. Além disso, é de relembrar que as células no LCR são muito frágeis, podendo, mesmo com a adição de um meio nutritivo, ter ocorrido degenerescência celular, com consequente redução do número de células analisadas. É importante referir, ainda, que, por vezes, por se tratarem de casos clínicos enviados por outros médicos veterinários, os animais chegam já medicados, muitas vezes com corticosteroides, o que

influencia a distribuição das populações celulares ao nível do LCR. Idealmente, todas as colheitas devem ser realizadas antes de qualquer terapia implementada.

### **2.5.1. Caso Clínico 1**

No primeiro caso clínico houve uma forte suspeita do diagnóstico ser uma MARC, uma das principais doenças não infecciosas que afetam o SNC. Os cães mais afetados são normalmente jovens adultos, entre os 8 e os 18 meses de idade, de raça Beagle, Boxer e Boiadeiro de Berna (Schwartz, Moore, & Tipold, 2008; Tipold & Jaggy, 1994; Tipold & Schatzberg, 2010). A MARC pode surgir com duas apresentações clínicas: uma forma aguda, que é mais frequente, e uma crónica, mais atípica. A forma aguda é caracterizada pelo aparecimento de sinais clínicos como febre, hiperestesia e rigidez cervical. Os resultados laboratoriais incluem uma leucocitose neutrofílica e, na citologia do LCR, uma pleocitose neutrofílica. Quanto à forma crónica, observam-se défices neurológicos adicionais e, na citologia do LCR, pode surgir uma ligeira pleocitose mononuclear ou mista (Tipold & Jaggy, 1994; Tipold, Vandeveld, & Zurbruggen, 1995). Histopatologicamente esta doença é caracterizada por um infiltrado de células inflamatórias nas meninges e por uma lesão inflamatório-estenótica nas artérias meníngeas (Cizinauskas et al., 2000). Os sinais clínicos apresentados neste caso clínico, nomeadamente, febre e dor cervical, assim como a presença de leucocitose neutrofílica nas análises sanguíneas, apoiam o diagnóstico. Os eventos analisados por CF do sangue periférico não demonstraram haver alterações significativas nas percentagens celulares diferenciais, comparativamente aos intervalos de referência, a não ser um ligeiro aumento da percentagem de monócitos (12,00%) relativamente aos valores normais (3 – 10%) (Zabolotzky & Walker, 2014). Os neutrófilos tiveram a maior percentagem (76,48%) comparativamente às restantes populações leucocitárias, com um valor muito próximo do limite máximo do intervalo de referência (60 – 77%) e os linfócitos foram a população menor, com 11,00%, estando ligeiramente abaixo do limite mínimo (12 – 30%) (Zabolotzky & Walker, 2014). O aumento ligeiro dos monócitos pode apoiar a suspeita de MARC, dado que a monocitose tem também sido associada a esta doença (Cizinauskas et al., 2000; Rose & Harcourt-Brown, 2013). A rara celularidade observada na citologia do LCR poderá ser justificada pela cronicidade da afeção, dada a ausência de pleocitose neutrofílica, típica da forma aguda da MARC. Contudo, nos resultados obtidos pela análise do LCR por CF, podem ser identificadas populações de leucócitos, evidenciando a presença sobretudo de neutrófilos e linfócitos (gráfico 3A), que não foram quantificadas. Nestes casos, a avaliação da população de neutrófilos por CF poderia ser importante, mediante a disponibilidade de anticorpos monoclonais específicos.

Segundo Schwartz et al. (2008), na MARC, há uma predominância dos linfócitos B sobre os T tanto no sangue periférico como no LCR, porém com uma maior diferença neste último, indicando a existência de uma entrada favorecida dos linfócitos B para o espaço subaracnoide

ou a existência de uma proliferação intensa de linfócitos B que tenham imigrado previamente. Ao nível do sangue periférico, essa predominância foi associada a uma diminuição dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, resultante de uma desregulação dos linfócitos T, que poderá explicar a síntese aumentada de IgA característica da MARC (Felsburg, HogenEsch, Somberg, Snyder, & Glickman, 1992; Tipold et al., 1995). Contrariamente ao descrito, a percentagem de linfócitos T (59,58%) detetada por CF ao nível do sangue, neste caso, é superior à dos linfócitos B. A presença de linfócitos T ativados pode querer indicar uma exposição prévia a um agente exógeno infeccioso ou não, ou a um antígeno endógeno (Tipold, Moore, Zurbriggen, & Vandeveld, 1999; Webb, Taylor, & Muir, 2002). No LCR, Schwartz et al. (2008) verificou também haver uma correlação positiva entre os níveis de IgA e a percentagem de linfócitos CD21<sup>+</sup>, apoiando a hipótese de haver uma produção intratecal de IgA. Mediante a possibilidade de utilizar anticorpos monoclonais específicos para os linfócitos B, como por exemplo anticorpos anti-CD21, teria sido interessante utilizar a CF para detetar possíveis aumentos na proporção de linfócitos B no LCR, mesmo que ao nível do sangue não tenha sido a subpopulação linfocítica predominante, contribuindo, deste modo, para o diagnóstico de MARC.

Dentro dos linfócitos T, verificou-se uma maior percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (60,44%) no sangue periférico do que de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, à semelhança dos achados de Schwartz e colaboradores (2008), embora com menor discrepância entre essas subpopulações. No LCR verificou-se um aumento significativo da percentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (87,85%) relativamente à encontrada no sangue, sendo muito superior à de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Comparativamente, os resultados de Schwartz et al. (2008) mostram que, mesmo que a diferença percentual entre as duas subpopulações de linfócitos T tenha sido inferior à verificada no sangue periférico, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> mantinham-se como subpopulação predominante no LCR, havendo, porém, alguns casos em que a predominância se invertia. Esta variação entre as diferentes subpopulações de linfócitos poderá refletir uma desregulação do sistema imunitário (Schwartz et al., 2008) que, pensa-se, resultar de uma interação do animal com fatores ambientais, estando na base do desenvolvimento da MARC (Tipold et al., 1999).

### **2.5.2. Caso Clínico 2**

No segundo caso clínico, havia uma suspeita de neoplasia do SNC, no encéfalo, de acordo com a TC realizada. As neoplasias do SNC podem ser primárias (e.g., meningiomas, gliomas e neoplasias do plexo coroide), com origem no próprio tecido nervoso, ou secundárias pela infiltração a partir de tecidos adjacentes ou por metástases. A grande maioria dos cães afetados têm uma idade igual ou superior a 5 anos e, a nível racial, Boxers e Golden Retrievers parecem ser predispostos para neoplasias primárias intracranianas (Dewey, 2016; O'Brien & Coates, 2010). Os sinais neurológicos causados por neoplasias encefálicas incluem

convulsões, alterações de comportamento, andamento em círculos, défices visuais, entre outros (Dewey, 2016; Santos et al., 2012). Neste caso clínico, os sinais apresentados estão de acordo com os descritos, além de que, o facto de se tratar de um Boxer com aproximadamente 5 anos, suporta fortemente a suspeita de neoplasia.

Os resultados da CF ao sangue periférico revelaram uma percentagem de linfócitos muito baixa (6,66%) comparativamente aos valores tabelados (12 – 30%) (Zabolotzky & Walker, 2014), não detetada no hemograma. A percentagem de monócitos suplantou a de linfócitos (8,51%), estando, ainda assim, dentro dos valores normais (3 – 10%) (Zabolotzky & Walker, 2014). Os neutrófilos não mostraram alterações significativas na percentagem relativa (78,43%), embora estejam ligeiramente acima dos valores tabelados (60 – 77%) (Zabolotzky & Walker, 2014). Estes resultados vão de encontro ao descrito por Itoh et al. (2009) em que, em comparação com cães saudáveis, os cães com neoplasias tiveram maiores contagens diferenciais de neutrófilos e monócitos, ao mesmo tempo que os linfócitos apresentaram contagens inferiores nos cães afetados. Os valores dos neutrófilos e monócitos poderão sugerir a existência de uma reação inflamatória nos locais de desenvolvimento da neoplasia e a possibilidade de haver uma infeção resultante da imunidade diminuída (García-Sancho, Villaescusa, Rodríguez-Franco, & Sainz, 2014). Por seu lado, a diminuição dos linfócitos poderá dever-se a uma inibição da expressão das moléculas CD3 ou CD21 por parte de citocinas e outros fatores imunossupressores produzidos pelas células neoplásicas (Watabe, Fukumoto, Komatsu, Endo, & Kadosawa, 2011). No LCR não foram obtidas as percentagens das populações leucocitárias e apesar de surgirem células com características de neutrófilos e macrófagos, estas populações não são facilmente identificáveis no *dot-plot* (gráfico 5A), tendo sido apenas marcada a população de linfócitos. No entanto, os resultados no sangue periférico espelham-se no LCR, se tivermos em conta os achados na citologia, nomeadamente, uma pleocitose moderada mista, constituída sobretudo por macrófagos e neutrófilos não degenerados. Os monócitos estão largamente distribuídos pelo organismo, diferenciando-se numa variedade de subtipos, com fenótipos distintos, de acordo com o tecido ou processo inflamatório em que se encontram e com a via de ativação a que foram sujeitos (Tizard, 2013c; Weiss & Souza, 2010). Os monócitos ativados têm um importante papel na patogénese de algumas doenças, podendo ser estimulador ou inibidor da afeção, dependendo da via de ativação. O envolvimento de macrófagos na pleocitose pode estar relacionado com o facto de estes, como mostram alguns estudos, poderem estar associados a neoplasias, visto que produzem uma série de fatores de crescimento que participam na proliferação de células neoplásicas e na angiogénese, sendo esta importante, senão determinante no desenvolvimento de neoplasias (Mantovani, Sozzani, Locati, Allavena, & Sica, 2015; Weiss & Souza, 2010). A participação dos neutrófilos pode ter que ver com uma possível infeção, inflamação ou necrose tecidual associada com neoplasias malignas (Watabe et al., 2011). Não obstante, a ocorrência de convulsões e a corticoterapia prolongada, referidas na história



clínica, podem ter contribuído para uma distribuição celular alterada, como referido anteriormente.

Abordando apenas a população de linfócitos, verificou-se na CF do sangue periférico, uma maior percentagem de linfócitos T (54,11%) do que de linfócitos B, apesar de a diferença não ser significativa. Estes resultados diferem dos obtidos por O'Neill, Guth, Biller, Elmslie e Dow (2009) em que a percentagem de linfócitos T foi notavelmente superior à dos linfócitos B, não só em cães saudáveis, como também em cães com neoplasias.

Dentro dos linfócitos T, a CF revelou que, no sangue, houve uma maior percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (63,40%) do que linfócitos T CD8<sup>+</sup>, o que está em concordância com os achados de O'Neill et al. (2009). No LCR, por sua vez, notou-se uma inversão evidente na população predominante, sendo a percentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (75,00%) muito superior à de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Esta predominância dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> poderá dever-se a uma imunossupressão mais acentuada dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> resultante da ação de fatores de crescimento específicos, produzidos pelas células neoplásicas, como sugerido num estudo com base na CF de sangue periférico de cães com neoplasias (Itoh et al., 2009).

### **2.5.3. Caso Clínico 3**

O terceiro caso clínico caracteriza-se por um quadro clínico progressivo com dor cervical e alterações funcionais nos membros que levaram à indicação para TC e colheita de LCR. Na TC, as lesões encontradas eram compatíveis com hérnias discais tipo II de Hansen na região cervical. Dos exames complementares realizados, é de realçar a positividade obtida apenas nas titulações de anticorpos, IgM anti-*Toxoplasma gondii* e IgG anti-*Rickettsia conorii*. As hérnias discais tipo II de Hansen são hérnias que resultam da degenerescência do disco intervertebral com protrusão do anel fibroso para o canal vertebral, causando uma compressão progressiva na medula espinhal (Coates, 2012; Jeffery, Levine, Olby, & Stein, 2013). Este tipo de hérnia afeta principalmente cães mais velhos, de raças grandes e está associado a DDIV cervical cujo sinal clínico mais comum é a hiperestesia cervical (Hansen, 1952; Santini et al., 2010), fatores que se enquadram neste caso clínico em particular. Os sinais clínicos além de surgirem frequentemente de forma crónica, lenta e progressiva, dependem da localização da hérnia e da gravidade da lesão da medula espinhal pela compressão. Além da hiperestesia espinhal, a apresentação clínica pode incluir, progressivamente, ataxia, paresia e paralisia (Jeffery et al., 2013; Lorenz, Coates, & Kent, 2011b; Santini et al., 2010). *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório do grupo das coccídeas que, embora tenha o gato como seu hospedeiro definitivo, pode infetar cães que servem como hospedeiros intermediários, enquistando nos seus tecidos. Os sinais clínicos podem ser localizados nos aparelhos respiratório, neuromuscular ou gastrointestinal, ou advir de uma infeção generalizada. Os sinais neurológicos dependem do local da lesão no SNC, podendo incluir convulsões, défices dos nervos cranianos, tremores, ataxia e paresia



ou paralisia (Dubey, Lindsay, & Lappin, 2009). Uma titulação de IgM anti-*Toxoplasma gondii* positiva, acompanhada de uma titulação de IgG anti-*Toxoplasma gondii* negativa, como se verifica neste caso clínico, pode indicar a presença de infecção recente ou ativa em cães, ainda que o diagnóstico seja considerado definitivo apenas se for detetado o parasita (Dubey & Lappin, 2012). As riquetsias são bactérias intracelulares obrigatórias, transmitidas por carraças, associadas a um conjunto de doenças febris que afetam os humanos (Greene, Kidd, & Breitschwerdt, 2012). Mesmo que os cães estejam frequentemente expostos ao agente, raramente se tornam clinicamente doentes quando infetados, estando descritos poucos casos de doença febril associados à infecção (Levin, Killmaster, & Zemtsova, 2012; Ortuño, Pons, Nogueras, Castellà, & Segura, 2009; Solano-Gallego et al., 2006). Os sinais clínicos característicos, além da febre, resultam de uma permeabilidade vascular aumentada, incluindo edema em diferentes órgãos, sinais oculares e sinais neurológicos (Greene et al., 2012). Neste caso clínico em particular, seria improvável a existência de uma infecção ativa por riquetsias uma vez que, para uma forte suspeita, seria necessária uma titulação positiva de IgM anti-*Rickettsia conorii*, que não foi testada, ou uma titulação positiva de IgG anti-*Rickettsia conorii* com um valor muito superior ao verificado nos testes serológicos (Greene et al., 2012). Além disso, é pouco provável que uma infecção por *Toxoplasma* ou riquetsias esteja na origem dos sinais clínicos, dado que as terapêuticas de eleição para estes parasitas, clindamicina e doxiciclina respetivamente, foram implementadas e não surtiram efeito.

Ao nível do sangue periférico, os resultados da CF revelam que a percentagem de linfócitos (11,47%), ainda que de forma ligeira, se encontra abaixo do intervalo de referência (12 – 30%) (Zabolotzky & Walker, 2014), podendo, de certo modo, refletir a linfopenia ligeira detetada ao hemograma. Por oposição, uma infecção por *Toxoplasma* normalmente caracteriza-se por uma linfocitose (Dubey et al., 2009). Já numa infecção por riquetsias tem sido demonstrada a redução de várias subpopulações de linfócitos, numa fase aguda (Mansueto et al., 2012). A percentagem de monócitos (12,62%), também de forma não significativa, encontra-se fora do intervalo de referência, acima do limite máximo considerado normal (3 – 10%), enquanto a de neutrófilos (70,70%) está de acordo com os valores normais tabelados (60 – 77%) (Zabolotzky & Walker, 2014). Ao nível do LCR, embora só tivéssemos destacada a população de linfócitos, pode ser também notada a presença de células com características semelhantes às dos monócitos/macrófagos (gráfico 7A). O mesmo não se verifica com as características que identificam os neutrófilos, que também foram raros na citologia do LCR. Nas hérnias discais tipo II de Hansen, a integridade do anel fibroso diminui, permitindo que os vasos sanguíneos entrem na periferia do disco intervertebral provocando alterações inflamatórias com a presença de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Kranenburg et al., 2013). Possivelmente, esta reação inflamatória crónica local descrita poderá estar refletida no LCR, neste caso clínico, atendendo aos resultados obtidos na CF (gráfico 7A). Segundo a literatura, o LCR de cães com degenerescência dos discos intervertebrais caracteriza-se por aumentos na

concentração de proteína e CTCN normais ou aumentadas, com pleocitoses variadas, sendo a predominância de células mononucleares e a de neutrófilos as mais descritas (Bohn, Wills, West, Tucker, & Bagley, 2006; Lorenz et al., 2011b; Srugo et al., 2011; Thomson et al., 1989; Windsor, Vernau, Sturges, Kass, & Vernau, 2008; Wood et al., 2012). Em cães com encefalite por *Toxoplasma*, tanto a concentração de proteína como as contagens de leucócitos podem estar aumentadas no LCR, normalmente, com uma população mista de células mononucleares, grandes e pequenas, e neutrófilos, enquanto o microrganismo raramente é encontrado (Dubey & Lappin, 2012). Contudo, além de ter sido detetada uma rara celularidade na citologia, não foram determinados os valores absolutos das populações de leucócitos pela CF, impedindo possíveis comparações.

Na população de linfócitos, a percentagem de linfócitos T (61,60%) excedeu a de linfócitos B, ao nível do sangue, à semelhança do que acontece nos cães saudáveis, não tendo sido obtida, nesta análise por CF, a percentagem correspondente ao nível do LCR. A resposta imunitária específica para material discal herniado em cães não tem sido descrita (Windsor et al., 2008). Num estudo em humanos com DDIV, a avaliação dos infiltrados de células inflamatórias, quando existentes, por meios colorimétricos mostrou a presença de linfócitos T e macrófagos, tendo tido, no entanto, um resultado negativo para os linfócitos B (Arai, Yasuma, Shitoto, Yamauchi, & Suzuki, 2000).

Relativamente às subpopulações de linfócitos T, a análise por CF ao sangue periférico mostrou uma predominância dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (65,18%) sobre os linfócitos T CD8<sup>+</sup>. À semelhança dos casos anteriores, houve uma inversão da subpopulação predominante no LCR, havendo apenas 37,64% de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Ainda que pouco provável, estes resultados podem refletir a importância da imunidade mediada por células no combate à infeção tanto por *Toxoplasma gondii* como por riquetsias. Nas infeções por *Toxoplasma gondii*, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> assumem o papel principal, embora os linfócitos T CD4<sup>+</sup> estejam também envolvidos, atuando através da produção de IFN- $\gamma$  e da indução da eliminação dos quistos formados (Suzuki et al., 2014; Wang, Kang, Kikuchi, & Suzuki, 2004). Quanto às infeções por riquetsias, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, juntamente com os macrófagos, são fonte de citocinas, como o IFN- $\gamma$ , que estimulam a produção de enzimas específicas pelas células endoteliais, que, por sua vez, ajudam a eliminar o microrganismo (Mansueto et al., 2012; Walker, 2007; Walker, Valbuena, & Olano, 2003). Além disso, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> têm a capacidade de induzir a apoptose das células endoteliais infetadas, sendo essenciais para uma resposta imunitária eficaz contra riquetsias (Valbuena, Feng, & Walker, 2002; Walker, 2007; Walker et al., 2003).

## D. Conclusão

A utilização da CF para a presente dissertação serviu para adquirir conhecimentos sobre os princípios em que se baseia, o funcionamento do citómetro de fluxo e o modo de preparação das amostras para posterior aquisição. Foi possível, também, proceder à interpretação de gráficos biparamétricos, o que permitiu compreender não só o padrão de expressão normal das células imunitárias como também o fenótipo associado a algumas afeções.

Nos casos clínicos apresentados, a análise de LCR por CF com imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos revelou que a percentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi superior à de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, por oposição ao que se verificou na análise do sangue periférico do caso correspondente. Essas inversões na predominância das subpopulações de linfócitos T no LCR, quando isoladamente avaliadas, não confirmam a presença de doença, uma vez que pode ocorrer em cães saudáveis. Contudo, uma vez que o LCR normal tem baixa celularidade e na ausência de valores de referência para este tipo de células no LCR, a presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> detetada deve ser considerada, por si, uma alteração. A predominância de uma ou de outra subpopulação é que nos poderá indicar possíveis grupos etiológicos e a patogenia envolvida, passível de causar a alteração verificada aquando do estudo por CF. Mas para tal, precisamos de uma maior amostragem para poder definir o *cut-off* para as análises de leucócitos no LCR nas diferentes doenças. Tendo em consideração os sinais clínicos, a história pregressa disponibilizada e os resultados dos exames complementares de diagnóstico efetuados, sobretudo os das citologias e exames imagiológicos, concluiu-se que as alterações verificadas poderão estar associadas às suspeitas de diagnóstico de cada caso, podendo contribuir, deste modo, para o estabelecimento do diagnóstico definitivo. Através da CF foi possível avaliar, inclusivamente, a distribuição de populações celulares no LCR, mesmo que a citologia tenha revelado rara celularidade, evidenciando que a CF pode fornecer informação adicional relevante para o diagnóstico que complementa a obtida atualmente pela análise de rotina de LCR. No entanto, é de referir que o facto de se tratar de LCR constitui uma dificuldade acrescida dada a escassez e fragilidade das células que frequentemente se verificam, fatores estes que levaram à exclusão da maioria das amostras analisadas. A deteção de poucos eventos/células pela CF inviabiliza a interpretação dos gráficos resultantes pela baixa quantidade e grande dispersão dos pontos visíveis nos *dot-plots*, pelo que, neste estudo, houve um reduzido número de amostras de LCR com celularidade suficiente para a obtenção de resultados significativos, o que limitou a utilização da CF e a informação passível de ser fornecida.

Mediante a disponibilidade de anticorpos monoclonais específicos, os serviços dos laboratórios de citometria permitem que sejam avaliadas muitas outras subpopulações celulares por CF, podendo até no futuro e na realidade portuguesa vir a constituir uma avaliação de rotina, aquando da suspeita de situações de disfunção, como ocorre já em

medicina humana. Porém, para tal, é necessária mais investigação para determinar o contributo da CF no diagnóstico de doenças com vista a alargar a gama de aplicações da CF em medicina veterinária, podendo assim, porventura, vir a ser parte integrante do plano de diagnóstico de um maior número de doenças. Embora fácil e rápida de executar, a CF é uma técnica dispendiosa, devendo ser avaliada a relação custo-benefício caso a caso. O médico veterinário tem um papel fundamental neste aspeto, na medida em que, uma vez conhecendo a técnica, deverá ser capaz de identificar que casos estarão indicados para a sua utilização e de interpretar os resultados obtidos de forma a facilitar a determinação do diagnóstico definitivo. Naturalmente que a informação obtida está dependente da quantidade de anticorpos monoclonais específicos utilizados contra diferentes agentes etiológicos, que, na prática clínica, por sua vez, está limitada a nível laboratorial por não haver tanta oferta de anticorpos monoclonais caninos. É então necessária uma ponderação da sua utilização, visto que, além disso, acarreta um esforço financeiro por parte do detentor do animal. Igualmente por isso, perante o objetivo de avaliar as possibilidades de utilização da imunofenotipagem mediante o uso da CF, apontamos como ponto menos forte, neste trabalho, a utilização de um grupo muito reduzido de anticorpos monoclonais. Tal não mascarou, contudo, a nossa perceção do quanto se pode avaliar com esta técnica e da informação que se pode cruzar com o conhecimento obtido, espelhando, de certo modo, a sua importância na prática clínica de acordo com as limitações referidas.

Deste modo e por fim, esta dissertação pode servir como ponto de partida para que se desenvolvam estudos que contribuam para um melhor conhecimento da distribuição das populações e subpopulações dos leucócitos, presentes no LCR canino, bem como das suas características, utilizando a CF como um meio complementar de diagnóstico útil em casos de doenças do SNC.

## E. Bibliografia

- Abate, O., Bollo, E., Lotti, D., & Bo, S. (1998). Cytological, immunocytochemical and biochemical cerebrospinal fluid investigations in selected central nervous system disorders of dogs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 45(1–10), 73–85.
- Abbott, N. J. (2004). Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochemistry International*, 45(4), 545–552.
- Adamo, P. F. (2010). Cerebrospinal fluid collection, myelography, epidurography, and discography. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat* (7th ed., pp. 1363–1372). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Agbayani, M. M., Braun, J., Chang, C. T., Glass, L., & Evans, H. E. (1981). Effect of CSF on bacterial growth. *Archives of Neurology*, 38(1), 43–45.
- Almeida, S. M. De, Rotta, I., Conto, A. J. De, Filho, D. A., Roda, C. D., Yamada, E. Y., & Singer, G. M. B. (2016). Higher positive identification of malignant CSF cells using the cytocentrifuge than the Suta chamber. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 74(10), 816–822.
- Andrews, J. M., & Schumann, G. B. (1990). Laboratory processing of cerebrospinal fluid specimens. *Diagnostic Cytopathology*, 6(2), 139–143.
- Arai, Y., Yasuma, T., Shitoto, K., Yamauchi, Y., & Suzuki, F. (2000). Immunohistological study of intervertebral disc herniation of lumbar spine. *Journal of Orthopaedic Science*, 5(3), 229–231.
- Avery, P. R., Burton, J., Bromberek, J. L., Seelig, D. M., Elmslie, R., Correa, S., ... Avery, A. C. (2014). Flow cytometric characterization and clinical outcome of CD4+ T-cell lymphoma in dogs: 67 cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(2), 538–546.
- Bakr, A., Silva, D., Cramb, R., Flint, G., & Foroughi, M. (2016). Outcomes of CSF spectrophotometry in cases of suspected subarachnoid haemorrhage with negative CT: Two years retrospective review in a Birmingham hospital. *British Journal of Neurosurgery*, 31(2), 223–226.
- Bauer, N. (2014). Cytological collection techniques and sample preparation. In J. Dunn (Ed.), *Manual of diagnostic cytology of the dog and cat* (pp. 7–9). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Becker, M., Bauer, N., & Moritz, A. (2008). Automated flow cytometric cell count and differentiation of canine cerebrospinal fluid cells using the ADVIA 2120. *Veterinary Clinical Pathology*, 37(3), 344–352.
- Behling-Kelly, E., Petersen, S., Muthuswamy, A., Webb, J. L., & Young, K. M. (2010). Neoplastic pleocytosis in a dog with metastatic mammary carcinoma and meningeal carcinomatosis. *Veterinary Clinical Pathology*, 39(2), 247–252.
- Behr, S., Trumel, C., Cauzinille, L., Palenché, F., & Braun, J.-P. (2006). High resolution protein electrophoresis of 100 paired canine cerebrospinal fluid and serum. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(3), 657–662.
- Behr, S., Trumel, C., Palenché, F., & Braun, J. P. (2003). Assessment of a pyrogallol red technique for total protein measurement in the cerebrospinal fluid of dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 44(12), 530–533.
- Bering Jr., E. A. (1955). Choroid plexus and arterial pulsation of cerebrospinal fluid: Demonstration of the choroid plexuses as a cerebrospinal fluid pump. *Archives of Neurology and Psychiatry*, 73(2), 165–172.

- Bering Jr., E. A. (1962). Circulation of the cerebrospinal fluid: Demonstration of the choroid plexuses as the generator of the force for flow of fluid and ventricular enlargement. *Journal of Neurosurgery*, 19(5), 405–413.
- Betters, D. M. (2015). Use of flow cytometry in clinical practice. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, 6(5), 435–440.
- Bhadelia, R. A., Bogdan, A. R., & Wolpert, S. M. (1995). Analysis of cerebrospinal fluid flow waveforms with gated phase-contrast MR velocity measurements. *American Journal of Neuroradiology*, 16(2), 389–400.
- Bicalho, K. A., Ribeiro, M. F. B., & Martins-Filho, O. A. (2004). Molecular fluorescent approach to assessing intraerythrocytic hemoprotezoan *Babesia canis* infection in dogs. *Veterinary Parasitology*, 125(3–4), 221–235.
- Bienzle, D., McDonnell, J. J., & Stanton, J. B. (2000). Analysis of cerebrospinal fluid from dogs and cats after 24 and 48 hours of storage. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216(11), 1761–1764.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G. I., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., & Engler, J. A. (1993). Matrix metalloproteinases: A review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4(2), 197–250.
- Bismarck, D., Schütze, N., Moore, P., Büttner, M., Alber, G., & Buttlar, H. V. (2012). Canine CD4+CD8+ double positive T cells in peripheral blood have features of activated T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 149(3–4), 157–166.
- Bohn, A. a, Wills, T. B., West, C. L., Tucker, R. L., & Bagley, R. S. (2006). Cerebrospinal fluid analysis and magnetic resonance imaging in the diagnosis of neurologic disease in dogs: A retrospective study. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(3), 315–320.
- Bonato, S., Christaki, U., Lefebvre, A., Lizon, F., Thyssen, M., & Artigas, L. F. (2015). High spatial variability of phytoplankton assessed by flow cytometry, in a dynamic productive coastal area, in spring: The eastern English Channel. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 154, 214–223.
- Brightman, M. W. (1977). Morphology of blood-brain interfaces. *Experimental Eye Research*, 25(1), 1–25.
- Brown, P. D., Davies, S. L., Speake, T., & Millar, I. D. (2004). Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience*, 129(4), 957–970.
- Brumback, R. A. (1989). Anatomic and physiological aspects of the cerebrospinal fluid space. In R. M. Herndon & R. A. Brumback (Eds.), *The cerebrospinal fluid* (p. 35). Boston, USA: Kluwer Academic Publishers.
- Bueno, R., Mello, M. N., Menezes, C. A. S., Dutra, W. O., & Santos, R. L. (2005). Phenotypic, functional, and quantitative characterization of canine peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(5), 521–524.
- Bund, D., Buhmann, R., Gökmen, F., Kremser, A., Dreyssig, J., Kolb, H. J., & Schmetzer, H. M. (2010). Canine-DCs using different serum-free methods as an approach to provide an animal-model for immunotherapeutic strategies. *Cellular Immunology*, 263(1), 88–98.
- Cancilla, P. A., Zimmerman, H. M., & Becker, N. H. (1966). A histochemical and fine structure study of the developing rat choroid plexus. *Acta Neuropathologica*, 6(2), 188–200.
- Carlson, B. M. (2009a). Formation of germ layers and early derivatives. In B. M. Carlson, *Human embryology and developmental biology* (4th ed., pp. 85–98). Philadelphia, USA: Mosby Elsevier.
- Carlson, B. M. (2009b). Nervous system. In B. M. Carlson, *Human embryology and developmental biology* (4th ed., pp. 239–270). Philadelphia, USA: Mosby Elsevier.

- Cellio, B. C. (2001). Collecting, processing, and preparing cerebrospinal fluid in dogs and cats. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 23(9), 786–793.
- Chabanne, L., Bonnefont, C., Bernaud, J., & Rigal, D. (2000). Clinical applications of flow cytometry and cell immunophenotyping to companion animals (dog and cat). *Methods in Cell Science*, 22(2–3), 199–207.
- Chabanne, L., Fournel, C., Caux, C., Bernaud, J., Bonnefont, C., Monier, J. C., & Rigal, D. (1995). Abnormalities of lymphocyte subsets in canine systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 22(1), 1–8.
- Chrisman, C. L. (1992). Cerebrospinal fluid analysis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 22(4), 781–810.
- Christopher, M. M. (1992). Bone marrow contamination of canine cerebrospinal fluid. *Veterinary Clinical Pathology*, 21(3), 95–98.
- Cizinauskas, S., Jaggy, A., & Tipold, A. (2000). Long-term treatment of dogs with steroid-reponsive meningitis-arteritis: Clinical, laboratory and therapeutic results. *Journal of Small Animal Practice*, 41(7), 295–301.
- Coates, J. (2012). Acute disc disease. In L. Garosi & S. Platt, *Small animal neurological emergencies* (pp. 399–400). London, UK: Manson Publishing.
- Comazzi, S., & Gelain, M. E. (2011). Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *The Veterinary Journal*, 188(2), 149–155.
- Cook, J. R., & DeNicola, D. B. (1988). Cerebrospinal fluid. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18(3), 475–499.
- Cook, J. R., & Levine, G. J. (2014). Cerebrospinal fluid and central nervous system cytology. In A. C. Valenciano & R. L. Cowell (Eds.), *Cowell and Tyler's diagnostic cytology and hematology of the dog and cat* (4th ed., pp. 222–243). Missouri, USA: Mosby Elsevier.
- Corn, S. C., Chapman, S. E., & Pieczarka, E. M. (2014). Flow Cytometry. In A. C. Valenciano & R. L. Cowell (Eds.), *Cowell and Tyler's diagnostic cytology and hematology of the dog and cat* (4th ed., pp. 540–549). Missouri, USA: Mosby Elsevier.
- Cornford, E. M., Varesi, J. B., Hyman, S., Damian, R. T., & Raleigh, M. J. (1997). Mitochondrial content of choroid plexus epithelium. *Experimental Brain Research*, 116(3), 399–405.
- Crow, S. E., Walshaw, S. O., & Boyle, J. E. (2009). Cerebrospinal fluid collection. In S. E. Crow, S. O. Walshaw, & J. E. Boyle, *Manual of clinical procedures in dogs, cats, rabbits, and rodents* (3rd ed., pp. 318–322). Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Culmsee, K., & Nolte, I. (2002). Flow cytometry and its application in small animal oncology. *Methods in Cell Science*, 24(1), 49–54.
- Cunningham, J. G. (2004). O fluido cerebrospinal e a barreira hematoencefálica. In J. G. Cunningham, *Tratado de fisiologia veterinária* (3ª edição, pp. 99–102). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Damkier, H. H., Brown, P. D., & Praetorius, J. (2010). Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport. *Physiology*, 25(4), 239–249.
- De Graaf, M. T., De Jongste, A. H. C., Kraan, J., Boonstra, J. G., Smitt, P. A. E. S., & Gratama, J. W. (2011). Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 80 B(5), 271–281.
- De Lahunta, A., & Glass, E. (2009). Cerebrospinal fluid and hydrocephalus. In A. De Lahunta & E. Glass, *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology* (3rd ed., pp. 57, 61–62). Missouri, USA: Saunders Elsevier.

- De Lorenzi, D., & Mandara, M. T. (2016). The central nervous system. In R. E. Raskin & D. J. Meyer (Eds.), *Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide* (3rd ed., pp. 369–390). Missouri, USA: Elsevier.
- Del Bigio, M. R. (1995). The ependyma: A protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia*, 14(1), 1–13.
- Del Bigio, M. R. (2010). Ependymal cells: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 55–73.
- Dellmann, H. D., & McClure, R. C. (1986). Generalidades sobre o sistema nervoso: Sistema nervoso central. In R. Getty, Sisson & Grossman: *anatomia dos animais domésticos* (5ª edição, pp. 186–206). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Depine-Berger, A.-E., Aanei, C., Iobagiu, C., Jeraiby, M., & Lambert, C. (2016). New tools in cytometry. *Morphologie*, 100(331), 199–209.
- Dewey, C. W. (2016). Encephalopathies : Disorders of the brain. In C. W. Dewey & R. C. da Costa (Eds.), *Practical guide to canine and feline neurology* (3rd ed., pp. 183–192). Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Dewey, C. W., da Costa, R. C., & Ducoté, J. M. (2016). Neurodiagnostics. In C. W. Dewey & R. C. da Costa (Eds.), *Practical guide to canine and feline neurology* (3rd ed., p. 65). Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Di Terlizzi, R., & Platt, S. (2006). The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I - function and composition. *The Veterinary Journal*, 172(3), 422–431.
- Di Terlizzi, R., & Platt, S. R. (2009). The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part II - analysis. *The Veterinary Journal*, 180(1), 15–32.
- Doyle, C., & Solano-Gallego, L. (2009). Cytologic interpretation of canine cerebrospinal fluid samples with low total nucleated cell concentration, with and without blood contamination. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(3), 392–396.
- Dubey, J. P., & Lappin, M. R. (2012). Toxoplasmosis and neosporosis. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed., pp. 806–817). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Lappin, M. R. (2009). Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 39(6), 1009–1034.
- Ducos, R., Donoso, J., Weickhardt, U., & Vietti, T. J. (1979). Sedimentation versus cytocentrifugation in the cytologic study of craniospinal fluid. *Cancer*, 43(4), 1479–1482.
- Duque, C., Parent, J., & Bienzle, D. (2002). The immunophenotype of blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(6), 714–719.
- Dux, R., Kindler-Rohrborn, A., Annas, M., Faustmann, P., Lennartz, K., & Zimmermann, C. W. (1994). A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid. *Journal of the Neurological Sciences*, 121(1), 74–78.
- Elias, A., & Brown, C. (2008). Cerebellomedullary cerebrospinal fluid collection in the dog. *Lab Animal*, 37(10), 457–458.
- Elliott, J. W. (2016). Treatment of acute undifferentiated leukaemia in a dog. *Veterinary Record Case Reports*, 4(1), 1–4.



- English, K., & Volk, H. (2014). Biochemical and cytological examination of cerebrospinal fluid. In J. Dunn (Ed.), *Manual of diagnostic cytology of the dog and cat* (pp. 135–138). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Evans, H. E., & De Lahunta, A. (2010). The nervous system. In H. E. Evans & A. De Lahunta, *Guide to the dissection of the dog* (7th ed., pp. 262–289). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Faldyna, M., Levá, L., Knötigová, P., & Toman, M. (2001). Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs - A flow cytometric study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 82(1–2), 23–37.
- Fallin, C. W., Raskin, R. E., & Harvey, J. W. (1996). Cytologic identification of neural tissue in the cerebrospinal fluid of two dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 25(4), 127–129.
- Faraci, F. M., Mayhan, W. G., & Heistad, D. D. (1989). Effect of serotonin on blood flow to the choroid plexus. *The American Journal of Physiology*, 478, 121–126.
- Feliu-Pascual, A. L., Garosi, L., Dennis, R., & Platt, S. (2008). Iatrogenic brainstem injury during cerebellomedullary cistern puncture. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 49(5), 467–471.
- Felsburg, P. J., HogenEsch, H., Somberg, R. L., Snyder, P. W., & Glickman, L. T. (1992). Immunologic abnormalities in canine juvenile polyarteritis syndrome: A naturally occurring animal model of Kawasaki disease. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 65(2), 110–118.
- Fishman, R. A., Ransohoff, J., & Osserman, E. F. (1958). Factors influencing the concentration gradient of protein in cerebrospinal fluid. *The Journal of Clinical Investigation*, 37(10), 1419–1424.
- Fletcher, T. F. (2013). Spinal cord and meninges. In H. E. Evans & A. De Lahunta, *Miller's anatomy of the dog* (4th ed., pp. 589–592, 604–610). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Fletcher, T. F., & Beitz, A. J. (2013). The brain. In H. E. Evans & A. De Lahunta, *Miller's anatomy of the dog* (4th ed., pp. 658–692). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Forterre, S., Raila, J., Forterre, F., Brunnberg, L., & Schweigert, F. J. (2006). Characterisation of transthyretin and retinol-binding protein in plasma and cerebrospinal fluid of dogs. *The Veterinary Journal*, 171(3), 451–455.
- Freeman, K. P. (2007). *Self-assessment colour review of veterinary cytology: Dog, cat, horse and cow*. London, UK: Manson Publishing.
- Frisk, A. L., König, M., Moritz, A., & Baumgärtner, W. (1999). Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3634–3643.
- Fry, M. M., Vernau, W., Kass, P. H., & Vernau, K. M. (2006). Effects of time, initial composition, and stabilizing agents on the results of canine cerebrospinal fluid analysis. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(1), 72–77.
- Furr, M. (2002). Antigen-specific antibodies in cerebrospinal fluid after intramuscular injection of ovalbumin in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(5), 588–592.
- Gama, F. G. V., Santana, A. E., Filho, E. de C., & Nogueira, C. A. da S. (2007). Agarose gel electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins of dogs after sample concentration using a membrane microconcentrator technique. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(1), 85–88.
- García-Sancho, M., Villaescusa, A., Rodríguez-Franco, F., & Sainz, Á. (2014). Comparative study of peripheral blood leukocytes in healthy dogs and in dogs with cancer and inflammatory diseases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(2), 282–285.

- Gherzi-Egea, J. F., Leininger-muller, B., Cecchelli, R., & Fenstermacher, J. D. (1995). Blood-brain interfaces: Relevance to cerebral drug metabolism. *Toxicology Letters*, 82–83(C), 645–653.
- Giaretta, F., Bussolino, S., Beltramo, S., Fop, F., Rossetti, M., Messina, M., ... Biancone, L. (2013). Different regulatory and cytotoxic CD4+ T lymphocyte profiles in renal transplants with antibody-mediated chronic rejection or long-term good graft function. *Transplant Immunology*, 28(1), 48–56.
- Givan, A. L. (2001). Seeing the light: Lasers, fluorochromes, and filters. In A. L. Givan (Ed.), *Flow cytometry: first principles* (2nd ed., pp. 59–80). New York, USA: Wiley-Liss.
- Greene, C. E., Kidd, L., & Breitschwerdt, E. B. (2012). Rocky mountain and mediterranean spotted fevers, cat-flea typhuslike illness, rickettsialpox, and typhus. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed., pp. 259–268). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Greene, C. E., & Vandevelde, M. (2012). Canine distemper. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed., pp. 34–35). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Hansen, H.-J. (1952). A pathologic-anatomical study on disc degeneration in dog: With special reference to the so-called enchondrosis intervertebralis. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 23(11), 1–130.
- Harvey, J. W. (2012). Hematology procedures. In J. W. Harvey, *Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas* (p. 11). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Ibrahim, S. F., & Engh, G. van den. (2007). Flow cytometry and cell sorting. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 106, 19–39.
- Intratecal (n.d.). In *Dicionário infopédia de Termos Médicos*. Acedido em Jun. 10, 2017, disponível em: <https://www.infopedia.pt/dicionarios/termos-medicos/intratecal>
- Itoh, H., Horiuchi, Y., Nagasaki, T., Sakonju, I., Kakuta, T., Fukushima, U., ... Takase, K. (2009). Evaluation of immunological status in tumor-bearing dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132(2–4), 85–90.
- Jacobs, R. M., Cochrane, S. M., Lumsden, J. H., & Norris, A. M. (1990). Relationship of cerebrospinal fluid protein concentration determined by dye-binding and urinary dipstick methodologies. *The Canadian Veterinary Journal*, 31(8), 587–588.
- Jalal, S., Nord, C. E., Lappalainen, M., & Evengard, B. (2004). Rapid sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(10), 937–939.
- Jaroszeski, M. J., & Radcliff, G. (1999). Fundamentals of flow cytometry. *Molecular Biotechnology*, 11(1), 37–53.
- Jeffery, N. D., Levine, J. M., Olby, N. J., & Stein, V. M. (2013). Intervertebral disk degeneration in dogs: Consequences, diagnosis, treatment, and future directions. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), 1318–1333.
- Joetzke, A. E., Eberle, N., Nolte, I., Mischke, R., & Simon, D. (2012). Flow cytometric evaluation of peripheral blood and bone marrow and fine-needle aspirate samples from multiple sites in dogs with multicentric lymphoma. *American Journal of Veterinary Research*, 73(6), 884–893.
- Johanson, C. E. (1988). The choroid plexus-arachnoid membrane-cerebrospinal fluid system. In A. A. Boulton, G. B. Baker, & W. Walz (Eds.), *The Neuronal Microenvironment* (Vol. 9, pp. 33–104). Humana Press.
- Johanson, C. E. (2008). Choroid plexus - cerebrospinal fluid circulatory dynamics: Impact on brain growth, metabolism, and repair. In P. M. Conn (Ed.), *Neuroscience in medicine* (3rd ed., pp. 173–176, 182, 184). Humana Press.

- Johanson, C. E., Duncan III, J. A., Klinge, P. M., Brinker, T., Stopa, E. G., & Silverberg, G. D. (2008). Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Research*, 5, 10.
- Johanson, C., McMillan, P., Tavares, R., Spangenberg, A., Duncan, J., Silverberg, G., & Stopa, E. (2004). Homeostatic capabilities of the choroid plexus epithelium in Alzheimer's disease. *Cerebrospinal Fluid Research*, 1(1), 3.
- Johnson, A. M. (2008). Amino acids and proteins. In C. A. Burtis, E. R. Ashwood, & D. E. Bruns, *Tietz fundamentals of clinical chemistry* (6th ed., pp. 302, 310–316). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Johnson, J. A., & Lott, J. A. (1978). Standardization of the Coomassie blue method for cerebrospinal fluid proteins. *Clinical Chemistry*, 24(11), 1931–1933.
- Johnson, P. J., & Constantinescu, G. M. (2000). Analysis of cerebrospinal fluid in horses. *Equine Veterinary Education*, 12(1), 13–17.
- Johnston, M. G., Boulton, M., & Flessner, M. (2000). Cerebrospinal fluid absorption revisited: Do extracranial lymphatics play a role? *The Neuroscientist*, 6(2), 77–87.
- Johnston, M., & Papaiconomou, C. (2002). Perspective cerebrospinal fluid transport: A lymphatic perspective. *News in Physiological Sciences*, 17(6), 227–230.
- Johnston, M., Zakharov, A., Koh, L., & Armstrong, D. (2005). Subarachnoid injection of Microfil reveals connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatics in the non-human primate. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 31(6), 632–640.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2008). Tecido nervoso. In L. C. Junqueira & J. Carneiro, *Histologia básica* (11<sup>a</sup> edição, pp. 153–181). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Kai, C., Ochikubo, F., Okita, M., Iinuma, T., Mikami, T., Kobune, F., & Yamanouchi, K. (1993). Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 55(6), 1067–1070.
- Keep, R. F., & Smith, D. E. (2011). Choroid plexus transport: Gene deletion studies. *Fluids and Barriers of the CNS*, 8(1), 26.
- Kent, M. (2012). Bacterial infections of the central nervous system. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed., pp. 1049–1054). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Kishimoto, M., Yamada, K., Ueno, H., Kobayashi, Y., & Wisner, E. R. (2004). Spinal cord effects from lumbar myelographic injection technique in the dog. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 66(1), 67–69.
- Kraan, J., Gratama, J. W., Haioun, C., Orfao, A., Plonquet, A., Porwit, A., ... Wilson, W. (2008). Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. *Current Protocols in Cytometry*, 45(6.25), 6.25.1-6.25.16.
- Kranenburg, H.-J. C., Grinwis, G. C. M., Bergknut, N., Gahrman, N., Voorhout, G., Hazewinkel, H. A. W., & Meij, B. P. (2013). Intervertebral disc disease in dogs – part 2: Comparison of clinical, magnetic resonance imaging, and histological findings in 74 surgically treated dogs. *The Veterinary Journal*, 195(2), 164–171.
- Kricka, L. J., & Park, J. Y. (2008). Optical techniques. In C. A. Burtis, E. R. Ashwood, & D. E. Bruns, *Tietz fundamentals of clinical chemistry* (6th ed., p. 81). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Lebech, A.-M., & Hansen, K. (1992). Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(7), 1646–1653.

- Levin, M. L., Killmaster, L. F., & Zemtsova, G. E. (2012). Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1), 28–33.
- Levine, J. M., & Levine, G. J. (2012). Neurologic disorders. In M. D. Willard & H. Tvedten, *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods* (5th ed., pp. 308–312). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Levine, J. M., Ruaux, C. G., Bergman, R. L., Coates, J. R., Steiner, J. M., & Williams, D. A. (2006). Matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid and serum of dogs with acute spinal cord trauma from intervertebral disk disease. *American Journal of Veterinary Research*, 67(2), 283–287.
- Lipitz, L., Rylander, H., & Pinkerton, M. E. (2011). Intramedullary epidermoid cyst in the thoracic spine of a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(6), e145-149.
- Lorenz, M. D., Coates, J. R., & Kent, M. (2011a). Confirming a diagnosis. In M. D. Lorenz, J. R. Coates, & M. Kent, *Handbook of veterinary neurology* (5th ed., pp. 81–84). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Lorenz, M. D., Coates, J. R., & Kent, M. (2011b). Pelvic limb paresis, paralysis, or ataxia. In M. D. Lorenz, J. R. Coates, & M. Kent, *Handbook of veterinary neurology* (5th ed., pp. 112, 136). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Lunn, J., Lee, R., Martin, P., & Malik, R. (2003). Antemortem diagnosis of canine neural angiostrongylosis using ELISA. *Australian Veterinary Journal*, 81(3), 128–131.
- Lydyard, P., & Grossi, C. E. (2006). Cells, tissues, and organs of the immune system. In D. Male, J. Brostoff, D. B. Roth, & I. Roitt, *Immunology* (7th ed., p. 32). Philadelphia, USA: Mosby Elsevier.
- Macey, M. G. (2007). Principles of flow cytometry. In M. G. Macey (Ed.), *Flow cytometry: principles and applications* (pp. 1–5, 12–14). New Jersey, USA: Humana Press.
- Maiolini, A., Carlson, R., Schwartz, M., Gandini, G., & Tipold, A. (2012). Determination of immunoglobulin A concentrations in the serum and cerebrospinal fluid of dogs: An estimation of its diagnostic value in canine steroid-responsive meningitis-arteritis. *The Veterinary Journal*, 191(2), 219–224.
- Mansueto, P., Vitale, G., Cascio, A., Seidita, A., Pepe, I., Carroccio, A., ... Walker, D. H. (2012). New insight into immunity and immunopathology of rickettsial diseases. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–26.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2015). Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, 23(11), 549–555.
- Marcos, R., & Santos, M. (2011). Líquido cefalorraquidiano. In M. da C. Peleteiro, R. Marcos, M. Santos, J. Correia, H. Pissarra, & T. Carvalho, *Atlas de citologia veterinária* (pp. 249–262). Lisboa: Lidel.
- Marcos, R., Santos, M., Marrinhas, C., Correia-Gomes, C., & Caniatti, M. (2016). Cytocentrifuge preparation in veterinary cytology: A quick, simple, and affordable manual method to concentrate low cellularity fluids. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(4), 725–731.
- Mariani, C. L., Boozer, L. B., Braxton, A. M., Platt, S. R., Vernau, K. M., McDonnell, J. J., & Guevar, J. (2013). Evaluation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the cerebrospinal fluid of dogs with intracranial tumors. *American Journal of Veterinary Research*, 74(1), 122–129.

- Martini, V., Poggi, A., Riondato, F., Gelain, M. E., Aresu, L., & Comazzi, S. (2015). Flow-cytometric detection of phenotypic aberrancies in canine small clear cell lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(3), 281–287.
- Mascalchi, M., Ciraolo, L., Tanfani, G., Taverni, N., Inzitari, D., Siracusa, G. F., & Dal Pozzo, G. C. (1988). Cardiac-gated phase MR imaging of aqueductal CSF flow. *Journal of Computer Assisted Tomography*, 12(6), 923–926.
- Matsuki, N., Fujiwara, K., Tamahara, S., Uchida, K., Matsunaga, S., Nakayama, H., ... Ono, K. (2004). Prevalence of autoantibody in cerebrospinal fluids from dogs with various CNS diseases. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 66(3), 295–297.
- Maurizi, C. P. (2003). The puzzle of where cerebrospinal fluid is absorbed: new pieces. *Medical Hypotheses*, 60(1), 102–103.
- Maxwell, D. S., & Pease, D. C. (1956). The electron microscopy of the choroid plexus. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 2(4), 467–474.
- McCarthy, D. A. (2007). Fluorochromes and fluorescence. In M. G. Macey (Ed.), *Flow cytometry: principles and applications* (p. 73). New Jersey, USA: Humana Press.
- McClure, J. T., Young, K. M., Fiste, M., Sharkey, L. C., & Lunn, D. P. (2001). Immunophenotypic classification of leukemia in 3 horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(2), 144–152.
- McGeady, T. A., Quinn, P. J., FitzPatrick, E. S., & Ryan, M. T. (2006a). Establishment of the basic body plan. In T. A. McGeady, P. J. Quinn, E. S. FitzPatrick, & M. T. Ryan, *Veterinary embryology* (pp. 54–58). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- McGeady, T. A., Quinn, P. J., FitzPatrick, E. S., & Ryan, M. T. (2006b). Gastrulation. In T. A. McGeady, P. J. Quinn, E. S. FitzPatrick, & M. T. Ryan, *Veterinary embryology* (p. 34). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- McGeady, T. A., Quinn, P. J., FitzPatrick, E. S., & Ryan, M. T. (2006c). Nervous system. In T. A. McGeady, P. J. Quinn, E. S. FitzPatrick, & M. T. Ryan, *Veterinary embryology* (pp. 153–175). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- McLaughlin, B. E., Baumgarth, N., Bigos, M., Roederer, M., De Rosa, S. C., Altman, J. D., ... Asmuth, D. M. (2008). Nine-color flow cytometry for accurate measurement of T cell subsets and cytokine responses. Part I: Panel design by an empiric approach. *Cytometry Part A*, 73(5), 400–410.
- Meric, S. M. (1988). Canine meningitis: A changing emphasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2(1), 26–35.
- Milhorat, T. H. (1975). The third circulation revisited. *Journal of Neurosurgery*, 42(6), 628–645.
- Millen, J. W., & Rogers, G. E. (1956). An electron microscopic study of the chorioid plexus in the rabbit. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 2(4), 407–416.
- Moore, P. F., Rossitto, P. V., Danilenko, D. M., Wielenga, J. J., Raff, R. F., & Severns, E. (1992). Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils. *Tissue Antigens*, 40(2), 75–85.
- Moriarty, A. T., Wiersema, L., Snyder, W., Kotylo, P. K., & McCloskey, D. W. (1993). Immunophenotyping of cytologic specimens by flow cytometry. *Diagnostic Cytopathology*, 9(3), 252–258.
- Nagano, S., Kim, S. H., Tokunaga, S., Arai, K., Fujiki, M., & Misumi, K. (2011). Matrix metalloprotease-9 activity in the cerebrospinal fluid and spinal injury severity in dogs with intervertebral disc herniation. *Research in Veterinary Science*, 91(3), 482–485.

- Nagy, K., Skagervik, I., Tumani, H., Petzold, A., Wick, M., Kühn, H.-J., ... Mattsson, N. (2013). Cerebrospinal fluid analyses for the diagnosis of subarachnoid haemorrhage and experience from a Swedish study. What method is preferable when diagnosing a subarachnoid haemorrhage? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(11), 2073–2086.
- Negrin, A., Cherubini, G. B., & Steeves, E. (2008). Angiostrongylus vasorum causing meningitis and detection of parasite larvae in the cerebrospinal fluid of a pug dog. *Journal of Small Animal Practice*, 49(9), 468–471.
- Nghiem, P. P., & Schatzberg, S. J. (2010). Conventional and molecular diagnostic testing for the acute neurologic patient. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1), 46–61.
- O'Brien, D. P., & Coates, J. R. (2010). Brain disease. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat* (7th ed., pp. 714, 722). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- O'Neill, K., Guth, A., Biller, B., Elmslie, R., & Dow, S. (2009). Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(4), 875–881.
- Oji, T., Kamishina, H., Cheeseman, J. A., & Clemmons, R. M. (2007). Measurement of myelin basic protein in the cerebrospinal fluid of dogs with degenerative myelopathy. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(3), 281–284.
- Oldendorf, W. H., Cornford, M. E., & Brown, W. J. (1977). The large apparent work capability of the blood-brain barrier: A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Annals of Neurology*, 1(5), 409–417.
- Orešković, D., & Klarica, M. (2010). The formation of cerebrospinal fluid: Nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Research Reviews*, 64(2), 241–262.
- Ortuño, A., Pons, I., Nogueras, M. M., Castellà, J., & Segura, F. (2009). The dog as an epidemiological marker of Rickettsia conorii infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(2), 241–242.
- Partington, T., & Farmery, A. (2014). Intracranial pressure and cerebral blood flow. *Anesthesia & Intensive Care Medicine*, 15(4), 189–194.
- Patrick, R. L., & Thiers, R. E. (1963). The direct spectrophotometric of protein in cerebrospinal fluid. *Clinical Chemistry*, 9(3), 283–295.
- Pedreira, C. E., Costa, E. S., Lecrevisse, Q., van Dongen, J. J. M., & Orfao, A. (2013). Overview of clinical flow cytometry data analysis: Recent advances and future challenges. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 415–425.
- Picot, J., Guerin, C. L., Kim, C. L. Van, & Boulanger, C. M. (2012). Flow cytometry: Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*, 64(2), 109–130.
- Pincus, M. R., Lifshitz, M. S., & Bock, J. L. (2017). Analysis: principles of instrumentation. In R. A. McPherson & M. R. Pincus (Eds.), *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods* (23rd ed., pp. 43–44). Missouri, USA: Elsevier.
- Platt, R., Ng, T., Glover, S., Roof, M., Kimura, K., & Roth, J. A. (2013). Canine peripheral blood lymphocyte phenotyping by 7-color multiparameter flow cytometry. *Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology*, 35(4), 197–204.

- Platt, S. R., Dennis, R., Murphy, K., & De Stefani, A. (2005). Hematomyelia secondary to lumbar cerebrospinal fluid acquisition in a dog. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 46(6), 467–471.
- Pollay, M. (1975). Formation of cerebrospinal fluid: Relation of studies of isolated choroid plexus to the standing gradient hypothesis. *Journal of Neurosurgery*, 42(6), 665–673.
- Pollay, M., & Curl, F. (1967). Secretion of cerebrospinal fluid by the ventricular ependyma of the rabbit. *American Journal of Physiology*, 213(4), 1031–1038.
- Praetorius, J. (2007). Water and solute secretion by the choroid plexus. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 454(1), 1–18.
- Quigley, K. A., Chelack, B. J., Haines, D. M., & Jackson, M. L. (2001). Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13(4), 297–300.
- Radaelli, S. T., & Platt, S. R. (2002). Bacterial meningoencephalomyelitis in dogs: A retrospective study of 23 cases (1990-1999). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(2), 159–163.
- Rakich, P. M., & Lamiter, K. S. (2011). Cytology. In K. S. Latimer (Ed.), *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology* (5th ed., pp. 354–356). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Redzic, Z. B., & Segal, M. B. (2004). The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(12), 1695–1716.
- Reggeti, F., & Bienzle, D. (2011). Flow cytometry in veterinary oncology. *Veterinary Pathology*, 48(1), 223–235.
- Reiber, H. (2003). Proteins in cerebrospinal fluid and blood: Barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 21(3–4), 79–96.
- Riond, B., Steffen, F., Schmied, O., Hofmann-Lehmann, R., & Lutz, H. (2014). Total protein measurement in canine cerebrospinal fluid: Agreement between a turbidimetric assay and 2 dye-binding methods and determination of reference intervals using an indirect a posteriori method. *Veterinary Clinical Pathology*, 43(1), 78–88.
- Rose, J. H., & Harcourt-Brown, T. R. (2013). Screening diagnostics to identify triggers in 21 cases of steroid- responsive meningitis-arteritis. *Journal of Small Animal Practice*, 54(11), 575–578.
- Rout, E. D., & Avery, P. R. (2017). Lymphoid neoplasia: Correlations between morphology and flow cytometry. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 47(1), 53–70.
- Sadler, T. W. (2012a). Third to eighth weeks: The embryonic period. In T. W. Sadler, *Langman's medical embryology* (12th ed., pp. 63–74). Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sadler, T. W. (2012b). Third week of development: Trilaminar germ disc. In T. W. Sadler, *Langman's medical embryology* (12th ed., pp. 51–57). Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Santini, G., Mazzanti, A., Beckmann, D. V., Santos, R. P., Pelizzari, C., Polidoro, D., & Baumhardt, R. (2010). Doença do disco intervertebral cervical em cães: 28 casos (2003-2008). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(8), 659–664.
- Santos, R. P., Figuera, R. A., Beckmann, D. V., Brum, J. S., Ripplinger, A., Neto, D. P., ... Mazzanti, A. (2012). Neoplasmas envolvendo o sistema nervoso central de cães: 26 casos (2003-2011). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(2), 153–158.

- Schatzberg, S. J., Haley, N. J., Barr, S. C., DeLahunta, A., Olby, N., Munana, K., & Sharp, N. J. H. (2003). Use of a multiplex polymerase chain reaction assay in the antemortem diagnosis of toxoplasmosis and neosporosis in the central nervous system of cats and dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 64(12), 1507–1513.
- Schwartz, M., Moore, P. F., & Tipold, A. (2008). Disproportionally strong increase of B cells in inflammatory cerebrospinal fluid of dogs with steroid-responsive meningitis-arteritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 125(3–4), 274–283.
- Sheppard, B. J., Chrisman, C. L., Newell, S. M., Raskin, R. E., & Homer, B. L. (1997). Primary encephalic plasma cell tumor in a dog. *Veterinary Pathology*, 34(6), 621–627.
- Silva, K. L. O., Melo, L. M., Perosso, J., Oliveira, B. B., Santos, P. S. P. dos, Eugênio, F. D. R., & Lima, V. M. F. de. (2013). CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce the apoptosis of CD4+ and CD8+ cells isolated from the peripheral blood and spleen of dogs naturally infected with *Leishmania* spp. *Veterinary Parasitology*, 197(3–4), 470–476.
- Skipor, J., & Thiery, J.-C. (2008). The choroid plexus - cerebrospinal fluid system: Undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 68(3), 414–428.
- Smith-Maxie, L. L., Parent, J. P., Rand, J., Wilcock, B. P., & Norris, A. M. (1989). Cerebrospinal fluid analysis and clinical outcome of eight dogs with eosinophilic meningoencephalomyelitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 3(3), 167–174.
- Smith, D. E., Johanson, C. E., & Keep, R. F. (2004). Peptide and peptide analog transport systems at the blood-CSF barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(12), 1765–1791.
- Snyder, J. M., Shofer, F. S., Winkle, T. J. Van, & Massicotte, C. (2006). Canine intracranial primary neoplasia: 173 cases (1986-2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(3), 669–675.
- Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Marco, M. Di, Caldin, M., Furlanello, T., & Breitschwerdt, E. (2006). Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1985–1988.
- Sprucek, F., Toman, M., Faldyna, M., & Svoboda, M. (2007). Immunological indicators in dogs affected by deep pyoderma. *Acta Veterinaria Brno*, 76(2), 283–290.
- Srugo, I., Aroch, I., Christopher, M. M., Chai, O., Goralnik, L., Bdolah-Abram, T., & Shamir, M. H. (2011). Association of cerebrospinal fluid analysis findings with clinical signs and outcome in acute nonambulatory thoracolumbar disc disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), 846–855.
- Steele, R. W., Marmer, D. J., O'Brien, M. D., Tyson, S. T., & Steele, C. R. (1986). Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(5), 965–966.
- Stowe, D. M., Escobar, C., & Neel, J. A. (2012). What is your diagnosis? Synovial fluid from a dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(3), 429–430.
- Strazielle, N., & Gherzi-Egea, J.-F. (2000). Choroid plexus in the central nervous system: Biology and physiopathology. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 59(7), 561–574.
- Subirá, D., Castañón, S., Aceituno, E., Hernández, J., Jiménez-Garófano, C., Jiménez, A., ... Orfao, A. (2002). Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice. *American Journal of Clinical Pathology*, 117(6), 952–958.



- Suzuki, Y., Sa, Q., Ochiai, E., Mullins, J., Yolken, R., & Halonen, S. K. (2014). Cerebral toxoplasmosis: Pathogenesis, host resistance and behavioural consequences. In L. M. Weiss & K. Kim (Eds.), *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan - perspectives and methods* (2nd ed., pp. 759–761, 780, 788). London, UK: Elsevier Ltd.
- Sykes, J. E., & Malik, R. (2012). Cryptococcosis. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed., p. 628). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Tarrant, J. M. (2005). The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *The Veterinary Journal*, 170(3), 278–288.
- Taylor, S. M. (2010). Exames diagnósticos do sistema neuromuscular. In R. W. Nelson & C. G. Couto, *Medicina interna de pequenos animais* (4ª edição, pp. 1010–1014). Rio de Janeiro, Brasil: Mosby Elsevier.
- Thalheim, L., Williams, L. E., Borst, L. B., Fogle, J. E., & Suter, S. E. (2013). Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), 1509–1516.
- Thomason, J., Archer, T., Mackin, A., Stokes, J., & Pinchuk, L. (2014). Applications of flow cytometry in veterinary research and small animal clinical practice. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, 1(1), 1004.
- Thompson, C. A., Russell, K. E., Levine, J. M., & Weeks, B. R. (2003). Cerebrospinal fluid from a dog with neurologic collapse. *Veterinary Clinical Pathology*, 32(2), 143–146.
- Thomson, C. E., Kornegay, J. N., & Stevens, J. B. (1989). Canine intervertebral disc disease: Changes in the cerebrospinal fluid. *Journal of Small Animal Practice*, 30(12), 685–688.
- Thomson, C., & Hahn, C. (2012). Regional neuroanatomy. In C. Thomson & C. Hahn, *Veterinary neuroanatomy: a clinical approach* (pp. 1–10). Edinburgh, UK: Saunders Elsevier.
- Thomson, C., Hahn, C., & Johnson, C. (2012). Neurohistology , physiology and supporting structures. In C. Thomson & C. Hahn, *Veterinary neuroanatomy: a clinical approach* (pp. 17–29). Edinburgh, UK: Saunders Elsevier.
- Timmann, D., Konar, M., Howard, J., & Vandeveld, M. (2007). Necrotising encephalitis in a French bulldog. *Journal of Small Animal Practice*, 48(6), 339–342.
- Tipold, A. (1995). Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: A retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 9(5), 304–314.
- Tipold, A., Fatzer, R., Jaggy, A., Zurbriggen, A., & Vandeveld, M. (1993). Necrotizing encephalitis in Yorkshire terriers. *Journal of Small Animal Practice*, 34(12), 623–628.
- Tipold, A., & Jaggy, A. (1994). Steroid responsive meningitis-arteritis in dogs: Long-term study of 32 cases. *Journal of Small Animal Practice*, 35(6), 311–316.
- Tipold, A., Moore, P., Jungi, T. W., Sager, H., & Vandeveld, M. (1998). Lymphocyte subsets and CD45RA positive T-cells in normal canine cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroimmunology*, 82(1), 90–95.
- Tipold, A., Moore, P., Zurbriggen, A., & Vandeveld, M. (1999). Lymphocyte subset distribution in steroid responsive meningitis-arteritis in comparison to different canine encephalitides. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 46(2), 75–85.
- Tipold, A., Pfister, H., & Vandeveld, M. (1993). Determination of the IgG index for the detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in dogs using an ELISA. *Research in Veterinary Science*, 54(1), 40–44.

- Tipold, A., Pfister, H., Zurbriggen, A., & Vandevelde, M. (1994). Intrathecal synthesis of major immunoglobulin classes in inflammatory diseases of the canine CNS. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 42(2), 149–159.
- Tipold, A., & Schatzberg, S. J. (2010). An update on steroid responsive meningitis-arteritis. *Journal of Small Animal Practice*, 51(3), 150–154.
- Tipold, A., Vandevelde, M., & Schatzberg, S. J. (2012). Neurologic diseases of suspected infectious origin and prion disease. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed., pp. 853–862). Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Tipold, A., Vandevelde, M., & Zurbriggen, A. (1995). Neuroimmunological studies in steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs. *Research in Veterinary Science*, 58(2), 103–108.
- Tizard, I. R. (2013a). Helper T cells and their response to antigen. In I. R. Tizard, *Veterinary Immunology* (9th ed., p. 140). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Tizard, I. R. (2013b). Immunodiagnostic techniques. In I. R. Tizard, *Veterinary Immunology* (9th ed., pp. 503–504). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Tizard, I. R. (2013c). Innate immunity: Macrophages and recovery from inflammation. In I. R. Tizard, *Veterinary Immunology* (9th ed., pp. 41–43). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Tizard, I. R. (2013d). Lymphocytes. In I. R. Tizard, *Veterinary Immunology* (9th ed., pp. 128, 130, 135). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Trowald-Wigh, G., Johannisson, A., & Hakansson, L. (1993). Canine neutrophil adhesion proteins and Fc-receptors in healthy dogs and dogs with adhesion protein deficiency, as studied by flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 38(3–4), 297–310.
- Valbuena, G., Feng, H. M., & Walker, D. H. (2002). Mechanisms of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. *Microbes and Infection*, 4(6), 625–633.
- Vandevelde, M., Zurbriggen, a., Steck, a., & Bichsel, P. (1986). Studies on the intrathecal humoral immune response in canine distemper encephalitis. *Journal of Neuroimmunology*, 11(1), 41–51.
- Vernau, W., Vernau, K. A., & Bailey, C. S. (2008). Cerebrospinal fluid. In J. J. Kaneko, J. W. Harvey, & M. L. Bruss (Eds.), *Clinical biochemistry of domestic animals* (6th ed., pp. 770–796). London, UK: Elsevier.
- Villaescusa, A., García-Sancho, M., Rodríguez-Franco, F., & Sainz, Á. (2012). Early-life longitudinal survey of peripheral blood lymphocyte subsets in Beagle dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 149(1–2), 126–131.
- Walker, D. H. (2007). Rickettsiae and rickettsial infections: The current state of knowledge. *Clinical Infectious Diseases*, 45(1), 39–44.
- Walker, D. H., Valbuena, G. A., & Olano, J. P. (2003). Pathogenic mechanisms of diseases caused by Rickettsia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, 1–11.
- Wamsley, H., & Alleman, A. R. (2004). Clinical pathology. In S. R. Platt & N. J. Olby (Eds.), *BSAVA manual of canine and feline neurology* (3rd ed., pp. 42–49). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Wang, X., Kang, H., Kikuchi, T., & Suzuki, Y. (2004). Gamma interferon production , but not perforin-mediated cytolytic activity, of T cells is required for prevention of toxoplasmic encephalitis in BALB/c mice genetically resistant to the disease. *Infection and Immunity*, 72(8), 4432–4438.

- Watabe, A., Fukumoto, S., Komatsu, T., Endo, Y., & Kadosawa, T. (2011). Alterations of lymphocyte subpopulations in healthy dogs with aging and in dogs with cancer. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 142(3–4), 189–200.
- Webb, A. A., Taylor, S. M., & Muir, G. D. (2002). Steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs with noninfectious, nonerosive, idiopathic, immune-mediated polyarthritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(3), 269–273.
- Weiss, D. J. (2001). Flow cytometric and immunophenotypic evaluation of acute lymphocytic leukemia in dog bone marrow. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(6), 589–594.
- Weiss, D. J. (2007a). An indirect flow cytometric test for detection of anti-neutrophil antibodies in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 68(5), 464–467.
- Weiss, D. J. (2007b). Evaluation of antineutrophil IgG antibodies in persistently neutropenic dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(3), 440–444.
- Weiss, D. J., & Souza, C. D. (2010). Monocytes and macrophages and their disorders. In D. J. Weiss & K. J. Wardrop (Eds.), *Schalm's veterinary hematology* (6th ed., pp. 298–303). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., & Couraud, P. O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(4), 842–857.
- Wessmann, A., Volk, H. A., Chandler, K., Brodbelt, D., & Szladovits, B. (2010). Significance of surface epithelial cells in canine cerebrospinal fluid and relationship to central nervous system disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 39(3), 358–364.
- Wilkerson, M. J. (2012). Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 42(1), 53–71.
- Wilkerson, M. J., Davis, E., Shuman, W., Harkin, K., Cox, J., & Rush, B. (2000). Isotype-specific antibodies in horses and dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(2), 190–196.
- Windsor, R. C., Sturges, B. K., Vernau, K. M., & Vernau, W. (2009). Cerebrospinal fluid eosinophilia in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(2), 275–281.
- Windsor, R. C., Vernau, K. M., Sturges, B. K., Kass, P. H., & Vernau, W. (2008). Lumbar cerebrospinal fluid in dogs with type I intervertebral disc herniation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), 954–960.
- Wolburg, H., & Paulus, W. (2010). Choroid plexus: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 75–88.
- Wood, A., Garosi, L., & Platt, S. (2012). Cerebrospinal fluid analysis. In L. Garosi & S. Platt, *Small animal neurological emergencies* (pp. 121–136). London, UK: Manson Publishing.
- Zabolotzky, S. M., & Walker, D. B. (2014). Peripheral blood smears. In A. C. Valenciano & R. L. Cowell (Eds.), *Cowell and Tyler's diagnostic cytology and hematology of the dog and cat* (4th ed., p. 458). Missouri, USA: Mosby Elsevier.
- Zakharov, A., Papaiconomou, C., Koh, L., Djenic, J., Bozanovic-Sosic, R., & Johnston, M. (2004). Integrating the roles of extracranial lymphatics and intracranial veins in cerebrospinal fluid absorption in sheep. *Microvascular Research*, 67(1), 96–104.
- Zimmerman, K., Almy, F., Carter, L., Higgins, M., Rossmeisl, J., Inzana, K., & Duncan, R. (2006). Cerebrospinal fluid from a 10-year-old dog with a single seizure episode. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(1), 127–131.